Zur Wirkung von Ganzkörper-Röntgenbestrahlung und Pharmaka auf die Regeneration von Mäusenieren nach Schädigung durch Folsäure

Harald Jähde

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546017_0010

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie
und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Komm.Vorstand: Prof. Dr. J. K a l i c h
Arbeit unter Anleitung von Univ. Doz. Dr. K. T e m p e l

ZUR WIRKUNG VON GANZKÖRPER-RÖNTGENBESTRAHLUNG UND PHARMAKA AUF DIE REGENERATION VON MÄUSENIEREN NACH SCHÄDIGUNG DURCH FOLSÄURE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
HARALD JÄHDE
aus
München

München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent:	Univ. Doz. Dr. K. Tempel
Korreferent:	Prof. Dr. J. von Sandersleben
Tag der Promotion:	2. VII. 1971

UNIV. LEIDEN BIBL.

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

M e i n e n E l t e r n

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Problemstellung	1
2.	Einleitung	2
2.1.	Regenerationsvorgänge in der Niere	2
2.1.1.	Einführung	2
2.1.2.	Regeneration der Niere nach Sublimatvergiftung	10
2.1.3.	Regeneration der Niere nach temporärer Ischämie	12
2.1.4.	Regeneration der Niere nach Folsäureschädigung	14
3.	Material und Methodik	17
3.1.	Reagentien und Tiermaterial	17
3.1.1.	Reagentien	17
3.1.2.	Tiermaterial	19
3.1.3.	Fütterung der Versuchstiere	19
3.1.4.	Behandlung der Tiere	19
3.1.4.1.	Applikation von Folsäure	19
3.1.4.2.	Applikation von Actinomycin D, Puromycin, TEM, PVS, DNS, Hostacortin(R) und SP_{54}(R)	19
3.1.4.3.	Bestrahlung	20
3.1.5.	Haltung der Tiere während der Versuche	20
3.1.6.	Aufarbeitung der Tiere	20
3.1.7.	Behandlung der Nieren	21
3.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	21
3.2.1.	Prinzip	21
3.2.2.	Lösungen	21
3.2.3.	Ausführung	22

		Seite
3.3.	Messung der Konzentration von DNS und säurelösl. DNS-Teilprodukten (Desoxy-Verbindungen)	22
3.3.1.	Prinzip	22
3.3.2.	Lösungen	23
3.3.3.	Ausführung	23
3.4.	Weitere methodische Hinweise	24
3.4.1.	Fehlerberechnung	24
3.4.2.	Signifikanzanalyse	25
4.	Ergebnisse	27
4.1.	Zur Reaktion der Niere auf hohe Folsäuredosen	27
4.1.1.	Überblick	27
4.1.2.	Relatives Frischgewicht	27
4.1.3.	Proteingehalt	28
4.1.4.	DNS-Gehalt	28
4.2.	Zur Hemmung der Folsäurereaktion (Dosisabhängigkeit)	34
4.2.1.	Actinomycin D	37
4.2.2.	Puromycin	39
4.2.3.	Triäthylenmelamin$^{(R)}$ (TEM)	41
4.2.4.	Ganzkörperbestrahlung (GKB)	43
4.2.5.	Polyvinylsulfat (PVS)	45
4.2.6.	Desoxyribonucleinsäure (DNS)	45
4.2.7.	Hydrocortison	47
4.2.8.	$SP_{54}{}^{(R)}$(Na-pentosanpolysulfuricum)	49
4.3.	Zur Hemmung der Folsäurereaktion (Zeitabhängigkeit)	51
4.3.1.	Relatives Frischgewicht	51
4.3.2.	Proteingehalt	51

		Seite
4.3.3.	DNS-Gehalt	52
4.4.	Ergebnisse im Überblick	56
5.	Diskussion	58
5.1.	Zur Reaktion der Niere auf hohe Folsäuredosen	58
5.2.	Zur Beeinflussung der durch Folsäure induzierten Reaktion der Niere	61
5.2.1.	Actinomycin D	61
5.2.1.1.	Wirkunsmechanismus	61
5.2.1.2.	Vorliegende Befunde	65
5.2.2.	Puromycin	67
5.2.2.1.	Wirkungsmechanismus	67
5.2.2.2.	Vorliegende Befunde	68
5.2.3.	Ionisierende Strahlen	70
5.2.3.1.	Wirkungsmechanismus	70
5.2.3.2.	Vorliegende Befunde	72
5.2.4.	Biologische Alkylantien (nebst TEM)	73
5.2.4.1.	Wirkungsmechanismus	73
5.2.4.2.	Vorliegende Befunde	75
5.2.5.	Polyanionen	77
5.2.5.1.	Wirkungsmechanismus	77
5.2.5.2.	Vorliegende Befunde	79
5.2.6.	Nebennierenrindenhormone	81
5.2.6.1.	Wirkungsmechanismus	81
5.2.6.2.	Vorliegende Befunde	82
6.	Zusammenfassung	84
	Summary	
7.	Literaturverzeichnis	
	Lebenslauf	

1. Problemstellung

Bei der Ratte und Maus führt Folsäure in hohen Dosen zu einer akuten, hochgradigen Nierenschädigung (12,13, 14). Für die sich anschließenden Regenerationsvorgänge sind auffallend hohe Ribonucleinsäure (RNS)-, Protein- und Desoxyribonucleinsäure (DNS)- Syntheseraten charakteristisch. Einzelne Reaktionsphasen laufen dabei weitgehend synchron (12,13,14,111,112,113,115).
Werden Umfang und Mechanismen chemischer oder physikalischer Einflüsse auf einzelne Reaktionsphasen untersucht, sollte das Modell der durch Folsäure ausgelösten Nierenschädigung daher ähnliche experimentelle Vorteile bieten wie die Regeneration der Leber nach Teilhepatektomie (16,34,42,116).
Die Gültigkeit dieser Aussage wird vorliegend am Verhalten von Protein- und Desoxyribonucleinsäure-Gehalt von Mäusenieren nach Schädigung durch Folsäure unter dem Einfluß von Actinomycin D, Puromycin, Prednisolon, Polyvinylsulfat (PVS), Pentosanpolysulfat ($SP_{54}{}^{(R)}$), heterologer DNS, 2,4,6-Triäthylenimino-s-triazin (Triäthylenmelamin$^{(R)}$, TEM) und Ganzkörper-Röntgenbestrahlung untersucht.

2. Einleitung

2.1. Regenerationsvorgänge in der Niere

2.1.1. Einführung

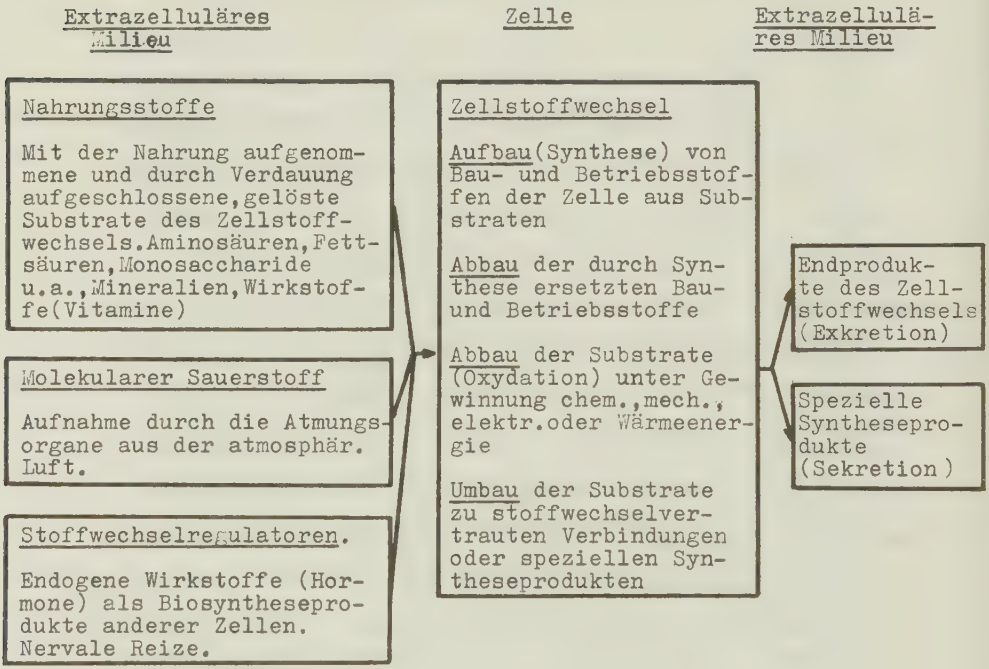
Die befruchtete Keimzelle enthält in ihrer DNS alle Informationen für ein geordnetes Wachstum,für die Zelldifferenzierung und Organbildung und die damit verbundene Synthese von Enzymen,Strukturproteinen und Regulationsstoffen.Die nach der Befruchtung der Keimzelle einsetzende Zellteilung würde unter exponentieller Zellvermehrung verlaufen und nicht zu einem Grenzwert führen, wenn nicht die Produktion spezifischer Induktionsstoffe und Hemmstoffe die Zelldifferenzierung lenken und eine ungehemmte Zellvermehrung verhindern würde.Die Zellteilung läßt sich durch typische Chromosomenbilder histologisch belegen (122).Eine direkte Beziehung zwischen den einzelnen Mitosephasen und den Synthesevorgängen der sich teilenden Zelle läßt sich jedoch bislang nicht herstellen.Im Verlauf einer Zellteilung wird zunächst bei noch konstanter DNS-Menge RNS synthetisiert.Es folgen dann die über Stunden sich hinziehende DNS-Replikation und anschließend erneute Synthese von RNS und Protein.Doch muß sich nicht notwendigerweise an jede DNS-Verdopplung eine Zellteilung anschließen.Auch eine Ansammlung der doppelten oder mehrfachen DNS-Menge in einer Zelle ist möglich (Polyploide Zellen),auf die eine spätere Zellteilung ohne DNS-Replikation folgen kann.

Bei der Reduktionsteilung der Geschlechtszellen findet überhaupt keine DNS-Synthese statt.

Der DNS-Bestand der somatischen (diploiden) Zellen verteilt sich auf die beiden haploiden Geschlechtszellen.Im Laufe der Embryonalentwicklung eines vielzelligen Organismus werden in einer festgelegten Folge bestimmte DNS-Abschnitte wirksam.Direkt oder indirekt führen sie zur Bildung stofflicher Faktoren,welche die Entwicklungsvorgänge während der Embryogenese steuern und die Differenzierung von Organen induzieren.Bei Amphibien hat man solche Induktionsstoffe für die Anlage des Nerven-,Muskel-und Nierengewebes und der Chorda in reiner Form erhalten und als Proteine identifiziert.Bei der Embryonalentwicklung des Huhnes löst ein "chondrogener Faktor" die Knorpelbildung aus.Bei den Insekten wird die Metamorphose durch das adenotrope Hormon,das Juvenilhormon und das Prothoraxdrüsenhormon -das Ecdyson- gesteuert.Die durch Ecdyson ausgelöste Genaktivität läßt sich an den Chromosomen an der Aufblähung ("Puffing") bestimmter DNS-Abschnitte im Lichtmikroskop erkennen. Andererseits gibt es auch zellspezifische Hemmstoffe, welche das Zellwachstum nach Erreichen der vorgegebenen Organform zum Stillstand bringen.Die Existenz solcher antimitotischer Hemmstoffe ("Chalone") hat man durch die Darstellung eines artspezifischen,aus der Epidermis gewonnenen und nur auf die Epidermis wirkenden Mitosehemmstoffes (Glykoprotein vom Mol.-Gew.25000) wahrscheinlich machen können.Man kann annehmen,daß es auch für andere Gewebe spezifisch antimitotisch wirksame Chalone gibt.(19,102).

Die Zelle als kleinste lebende Einheit scheint in weitem Maße über die Steuerungseinrichtungen selbst zu verfügen, die für das Zusammenspiel zahlreicher ununterbrochen neben- und nacheinander in der Zelle ablaufender chemischer Reaktionen nötig sind.

Schematische Darstellung des Stoffwechsels einer tier. Zelle



Die beim Abbau der Substrate gewonnene Energie benötigt die Zelle für Syntheseleistungen, d.h. für die Erneuerung ihrer chemischen Bausteine, die Aufrechterhaltung ihrer Temperatur, aber auch zur Produktion spezifischer Stoffwechselprodukte, die von der Zelle abgegeben

(sezerniert)werden ,um im Organismus weitere Funktionen zu erfüllen.Hierunter fallen besonders auch die Enzyme. Erst ihre Gegenwart bewirkt eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit in einer für den Stoffwechsel und die laufende Energiegewinnung erforderlichen Größenordnung. Die der Funktion der Zelle angepaßte Produktion aller für den Ablauf des Stoffwechsels notwendigen Enzyme bildet die Vorraussetzung für die normale Zelltätigkeit.

Das System,über das die Eiweiß- und damit Enzymbildung gesteuert wird,ist der genetische Apparat der Zelle. Von der gesamten genetischen Information,die jeder Zelle zur Verfügung steht,wird von den einzelnen Zellen der Organe und Gewebe jedoch in ganz unterschiedlichem Umfang Gebrauch gemacht.Dies erklärt ihre unterschiedlichen biochemischen Leistungen und Funktionen.Der Abschnitt des DNS-Moleküls,der ein Protein(z.B.ein Enzym) codiert, wird als Gen bezeichnet.Gene sind also Funktionseinheiten im genetischen Material,denen definierte Nucleotidabschnitte der DNS entsprechen,und die die Information für die Synthese einer bestimmten Peptidkette enthalten (19).

Die Gene bestehen aus Desoxyribonucleinsäure,einem aus einer sehr großen Zahl von Nucleotiden (Base-Desoxyribose-Phosphorsäure) zusammengesetzten Riesenmolekül mit einem Molekulargewicht von mehreren 100 Mill.(58).

In der DNS finden wir 4 Basen:Adenin,Guanin,Cytosin und Thymin.Die Erbeigenschaften,auch als genetischer

Code bezeichnet,sind -chemisch gesehen- durch die unterschiedliche Reihenfolge der 4 genannten Basen in den DNS-Strängen determiniert.Da es vor jeder Zellteilung zur Verdopplung der DNS kommt,besitzt grundsätzlich jede Zelle in einem Individuum die gleiche Art und Zahl von DNS-Molekülen und somit alle Erbeigenschaften und Potenzen.Aus dem Vorgang der Zelldifferenzierung bei der Entwicklung eines Individuums müssen wir folgern,daß der größte Teil aller DNS-Moleküle einer Zelle sich an deren genetischer Ausprägung nicht beteiligen kann. Auch von den restlichen DNS-Molekülen ist stets ein Teil reversibel reprimiert,d.h.durch sog.Repressoren am Wirksamwerden gehindert.Die genetische Steuerung der Eiweiß-und Enzymsynthese erfolgt in der Weise,daß an der DNS die Messenger-Ribonucleinsäure (m-RNS) gebildet wird,die nach dem Prinzip der Basenpaarung die genetische Information übernimmt und zugleich vervielfältigt (15,39,96,124).

Ribonucleinsäuren besitzen ein wesentlich kleineres Molekulargewicht als die DNS,statt Desoxyribose Ribose und statt der Base Thymin das Uracil.Man unterscheidet zwischen der Boten-oder Messenger-RNS,der Transport- oder t-RNS und der am Aufbau der Ribosomen beteiligten r-RNS.Die an der DNS des Zellkerns gebildete m-RNS gelangt in das Zytoplasma und lagert sich Ribosomen,die vorwiegend wiederum aus RNS und Eiweiß aufgebaut sind, an.Im Zytoplasma gelöst befindet sich die sog.Transfer-Ribonucleinsäure.Für jede der 21 Aminosäuren gibt es

spezifische t-RNS-Moleküle.Sie verbinden sich mit den zugehörigen aktivierten Aminosäuren und transportieren diese an bestimmte Stellen der den Ribosomen angelagerten m-RNS.Die Verbindung zwischen t-RNS und m-RNS ist durch die Basensequenz einerseits in der m-RNS,andererseits in der t-RNS örtlich festgelegt (83,84). Deshalb können die Aminosäuren an den Ribosomen in determinierter Reihenfolge miteinander zu Peptiden,Polypeptiden und Eiweißkörpern vereinigt werden.

Auch der Vorgang der Zellteilung wird genetisch gesteuert (38). Dies gilt sowohl für die DNS-Reduplikation als auch für die Bildung von spezifischen Eiweißkörpern und Enzymen,die speziell für die Zellteilung benötigt werden.Es ist anzunehmen,daß die jeder einzelnen Zelle zukommenden autochtonen Wachstums-und Teilungspotenzen die embryonale Entwicklungsphase einschließlich der Zelldifferenzierung vorwiegend beherrschen (43).

Versuche mit antiandrogenen Substanzen haben gezeigt, daß das in den Keimdrüsen männlicher Föten gebildete Testosteron bereits in die Vorgänge der Organdifferenzierung eingreift,da es nach Behandlung der Muttertiere mit antiandrogenen Substanzen zur Hemmung der Entwicklung eines männlichen Genitalapparates kommt (83).

Im postnatalen Leben,wenn die Differenzierung in die einzelnen Organe längst abgeschlossen ist,greifen dann mehrere körpereigene Substanzen sozusagen von außen her in die Stoffwechselvorgänge der Zelle ein.Das sind neben den Übertrügerstoffen des Nervensystems die Hormone.

Organ-und Körperwachstum werden im frühen Kindesalter durch das im Hypophysenvorderlappen gebildete Wachstumshormon gefördert.Mit dem Eintritt in die Pubertät gerät der Zellstoffwechsel unter den Einfluß der Sexualhormone,wobei die stoffwechselanabole Wirkung des Testosterons die der Östrogene übertrifft.Selbstverständlich werden Wachstum und Stoffwechselfunktion der Zelle auch von den Hormonen der Schilddrüse,der Nebennierenrinde, durch das Insulin usw. beeinflußt.

Grundeigenschaften der Zelle sind die Fähigkeit zu wachsen,sich zu teilen und ihren Stoffwechsel zu steuern.Bei der Steuerung dieser Vorgänge nimmt,wie schon gesagt,der genetische Apparat der Zelle eine wichtige Stelle ein; denn die DNS des Zellkerns steuert über die Bildung der RNS,speziell der m-RNS,die Eiweiß-und Enzymsynthese und damit praktisch den Ablauf aller chemischen Vorgänge in der Zelle.Außerdem kann sich die DNS selbst vermehren und gleichzeitig die Bildung mitosespezifischer Eiweißkörper und Enzyme veranlassen,Vorgänge,die wiederum genetisch gesteuert werden.Zur Anpassung an die jeweiligen Erfordernisse unterliegt die Funktion der DNS kontinuierlich dem Vorgang der Induktion und Repression. Darunter versteht man folgende von JACOB und MONOD (56,57) an Mikroorganismen weitgehend aufgeklärten Vorgänge:

An speziellen Genanteilen,den sogenannten Regulatorgenen,werden Repressoren,bisher chemisch noch nicht identifizierte Verbindungen,gebildet,die die RNS-Synthese

am Operatorgen und den diesem untergeordneten Strukturgenen verhindern. Durch sogenannte Induktoren, das sind im Stoffwechsel der Zelle selbst entstandene Verbindungen oder von außen in die Zelle gelangende Substanzen, kann der Repressor inaktiviert werden, ein Vorgang, der zur Freigabe bestimmter Operator-und Strukturgene führt, an denen dann ungehindert die Neubildung von m-RNS und über diese die Neubildung von Eiweiß und Enzymen erfolgen kann (52,60,99,119).

HEIM et al.(49) kommen aufgrund ihrer Versuche mit weißen Mäusen verschiedener Altersgruppen zu der Feststellung, daß das Wachstum bis zum Eintritt der Pubertät, wahrscheinlich unter dem Einfluß des hypophysären Wachstumshormons, in der Hauptsache aus einer erhöhten Zellvermehrung besteht. Dem geht eine verstärkte Neubildung von DNS, RNS, Protein sowie mitosespezifischer m-RNS und Enzymen voraus. Etwa vom 25. Lebenstag an verstärkt sich zunehmend der Einfluß der Sexualhormone, wobei das Testosteron einen größeren wachstumsfördernden Effekt aufweist als die Östrogene. Nunmehr kommt es vor allem zu einer Zunahme des Zellvolumens. Die Zellneubildung tritt in den Hintergrund. Die Verabreichung von anabolen Steroiden führte in den Untersuchungen von HEIM et al. bei sämtlichen Tieren zu einer Gewichtszunahme der Nieren. und zu vermehrter Bildung von DNS, RNS und Eiweiß unter gleichzeitiger Zunahme des Zellvolumens. Eine erhöhte Zellneubildung wurde nur bei älteren Tieren gesehen. Wahrscheinlich stimulieren Anabolica das durch das Alter "geschädigte" genetische System.

2.1.2. Regeneration der Niere nach Sublimatvergiftung

Sublimat ($HgCl_2$), dessen toxische Dosis für den Menschen bei 0,1 - 0,2g und dessen letale Dosis bei etwa 0,5g liegt, ruft in den Tubulusepithelien der Niere in Abhängigkeit von der Konzentration mehr oder weniger starke Nekrosen hervor. Bereits im Jahre 1909 beschrieb HEINECKE (z.b.55) 10 Fälle von Sublimatnephrose beim Menschen. Er stellte bereits 7 Stunden nach der Sublimatintoxikation massenhaft Nekrosen fest und erklärte den Zelltod mit der direkten Einwirkung des Sublimats auf die Tubulusepithelien. Die Konzentration des Sublimats in den Epithelien infolge Rückresorption aus dem Primärharn sah STAEMMLER (z.b.55) als Ursache für die "Koagulationsnekrose" in den Tubulusepithelien an. An den Glomerula fand er keine Veränderungen, die auf eine unmittelbare Einwirkung des Sublimats hingewiesen hätten. MÖLBERT, HUHN und BÜCHNER beschrieben bei der Sublimatvergiftung als den entscheidenden, in der Koagulationsnekrose endigenden Vorgang "eine Ansammlung von Protein in den Zytosomen und im Zytoplasma der Zelle, hervorgerufen durch die proteinfällende Wirkung des Sublimats" (z.b.55). K. HÜBNER und P. KEMPF (55) verabreichten Ratten eine geringe Sublimatdosis (0,5ml der 0,2%o Lösung pro 100g Körpergewicht) und fanden hierbei nur eine minimale Schädigung des Nierengewebes in Form von Nekrosen. Es zeigte sich jedoch eine ausgeprägte Aktivierung der DNS-Synthese in allen untersuchten Tubulusabschnitten.

Am deutlichsten war die DNS-Synthese im Bereich der geraden Hauptstücke; es folgten die Glomerula. Am schwächsten war die Synthese in den Tubuli contorti I. Die Verfasser bringen diese verschiedengradige Anregung der DNS-Synthese in direkten Zusammenhang mit der Größe der Sublimatschädigung in den entsprechenden Bereichen des Nierenparenchyms. Als wichtigstes Ergebnis ihrer Untersuchungen fanden sie, daß die DNS-Synthese in den Tubulusepithelien und den Glomerulumzellen der Nieren nach einer leichten Sublimatvergiftung nicht kontinuierlich, sondern in einem regelmäßigen Rhythmus erfolgt. Letzterer beginnt 2 Tage nach der Intoxikation mit Sublimat mit einem ersten steilen DNS-Synthesegipfel und weist am 9. und 16. Versuchstage weitere Synthesemaxima auf.
Die Epithelneubildung erfolgte diffus in dem Bereich der an der Regeneration beteiligten Tubulusabschnitte, im Gegensatz zu den Beobachtungen von NOLTENIUS et al. (zb55), die nach Sublimatintoxikation die Entwicklung einer Indifferenzzone feststellten, aus der die Neubildung der Tubulusepithelien erfolgte. HÜBNER kommt -bekräftigt durch ähnliche Feststellungen nach temporärer Ischämie (1964) und nach kontralateraler Nephrektomie (1965, 1967)- zu dem Schluß, daß alle Tubulusepithelien regenerationsfähig sind, und die Zellneubildung nicht auf eine Indifferenzzone beschränkt ist (53, 54).

2.1.3. Regeneration der Niere nach temporärer Ischämie

Die Unterbrechung der Blutzirkulation für eine bestimmte Zeit (etwa 30 - 100 Minuten) führt z.B.in Leber und Niere zu empfindlichen Störungen der Stoffwechselvorgänge in den einzelnen Zellen bestimmter Organabschnitte. Sie dient daher häufig als Versuchsmodell für Regenerationsvorgänge.Bei der Ratte sah STÖCKER (104) nach 1-stündiger Nierenischämie,daß der dadurch ausgelöste Wachstumsreiz die minimale Dauer der Mitose und die mittlere Dauer der DNS-Synthese verkürzte.Der Proliferationsmodus glich sich damit weitgehend dem schnell proliferierender Systeme an.HÜBNER (53) zeigte autoradiographisch,daß nach einer temporären Ischämie von 20 bzw. 40 min bei der Ratte die DNS-Synthese sprunghaft am 2. bzw. 3.Tag nach Wiederdurchblutung ansteigt.Nach anschließend deutlichem Abfall ergab sich am 9.bzw. 10.Tag ein zweiter, etwas kleinerer Synthesegipfel.REIF und LANGE (89) verglichen biochemische,histochemische,fluoreszenzoptische und histologische Befunde an der sich nach 90 min andauernder Ischämie regenerierenden Kaninchenniere. Einen Tag nach Wiederdurchblutung fanden sich ausgedehnte Nekrosen im Bereich der Haupt-und Mittelstückepithelien,besonders an den geraden Hauptstücken.Die noch erhaltenen Epithelien zeigten z.T.leichte Kernschwellung. Der DNS-Gehalt lag im Bereich des Normalen,während der RNS-Gehalt im Ansteigen begriffen war und am 3.Tag sein

Maximum erreicht.Der relative DNS-Gehalt war am 2.Tag maximal vergrößert und fiel dann leicht ab.Am 7.Tag zeigte sich ein erneuter Anstieg.Die Proteinsynthese in der postischämischen Niere verhielt sich ähnlich.Sie erreichte gleichfalls am 2.Tag nach Wiederaufnahme der Durchblutung ein Maximum.Um den 8.Tag ergab sich ein beiderseits deutlich abgesetztes Proteinsynthese-Minimum.Auch der RNS-Gehalt nahm vom 9.Tag an wieder an Größe zu.Wie die Versuche ergaben,setzte die RNS-Synthese vor der DNS-Synthese verstärkt ein.Man kann daraus schließen,daß die RNS früher als die DNS auf den Regenerationsreiz nach Ischämie anspricht.Auch Untersuchungen an der regenerierenden Leber nach Teilhepatektomie führten zu dem Ergebnis,daß die RNS-Synthese schon während der ersten 2 Stunden,die DNS-Synthese dagegen erst nach 12 Stunden einsetzt (16,34,116).Nach biochemischen Untersuchungen von HALLIBURTON und THOMSON (42) am kompensatorischen Nierenwachstum nach unilateraler Nephrektomie ist die kompensatorische Hypertrophie innerhalb der ersten 24 Stunden durch einen stark erhöhten RNS/DNS-Quotienten charakterisiert,der durch eine Zunahme der RNS bedingt ist.Auch bei der postischämischen Regeneration war der RNS/DNS-Quotient erhöht.Der Proteingehalt erreichte zwar am 2.Tag seinen höchsten Wert,bestand aber vorwiegend aus extrazellulärem Protein (Proteingehalt des interstitiellen Ödems,Eiweißzylinder,eingewanderte Granulo-und Lymphocyten).Der Gesamtproteingehalt und

der Fermenteiweißbestand der Einzelzelle waren dagegen reduziert.Selbst am 9.Tag war noch keine völlige Normalisierung der Fermentaktivitäten eingetreten.

2.1.4. Regeneration der Niere nach Folsäureschädigung

Ähnlich wie nach Verabreichung von Sublimat,Bichromat, Glycerin oder temporärer Ischämie eignet sich auch die Schädigung der Niere durch hohe Folsäure-Dosen als Modell zum Studium renaler Funktionsstörungen nebst Regenerationsvorgängen.Verantwortlich hierfür ist nach BRADE et al.(12,23) wahrscheinlich der Pteridinanteil der Folsäure,da man auch mit den Pteridinderivaten 2-Amino-4-hydroxypteridin und Xanthopterin Nierenproliferationen auslösen kann,während die Folsäurebestandteile 4-Aminobenzoylglutaminsäure bzw.Glutaminsäure in dieser Beziehung unwirksam sind.Die einmalige i.v.Applikation von 500mg Folsäure/kg Körpergewicht führt bei der Ratte zu einer akuten Störung der Nierenfunktion.Anfangs kommt es dabei zu einer 15-stündigen oligo-anurischen Phase,gefolgt von einer hyposthenurisch-diuretischen Phase.Flüssigkeits-und Elektrolytretentionen sowie eine Einschränkung der glomerulären Filtration sind Ausdruck der oligo-anurischen Phase.Auch nach 10 Tagen war die glomeruläre Filtration noch um 44% gegenüber den Kontrollen herabgesetzt.Nach 21 Tagen war keine Senkung mehr nachweisbar.Die Veränderungen der Gewebselektrolyte

in der frühen diuretischen Phase bestehen in einer Verminderung der extrazellulären und Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration bei unverändertem Gesamt-Natriumgehalt sowie in einer Verminderung der intra-und extrazellulären Kaliumkonzentration bei erniedrigtem Gesamt-Kaliumgehalt.Sie sind zum Teil durch Gewebsabbau in den ersten 96 Std. nach Folsäuregabe bedingt.Ausdruck der Schädigung der Niere durch Folsäure ist auch die Erhöhung des Rest-N im Serum.Das Maximum wird am 1.und 2. Tag nach der Folsäureapplikation erreicht.Noch nach einer Woche ist der Rest-N gegenüber dem der Kontrollen deutlich erhöht.Er deutet auf einen verstärkten endogenen Eiweißabbau und die schon erwähnte verminderte Filtrationsleistung der Glomerula hin.Da etwa 75% der verabreichten Folsäuremenge innerhalb der ersten 24 Stunden bereits wieder ausgeschieden werden, ist anzunehmen,daß kein direkter Zusammenhang zwischen der Anreicherung der Folsäure in der Niere und ihrer Wirkung besteht.Beachtenswerte Zellschädigungen betreffen hauptsächlich den Bereich der geraden Hauptstücke (Mitochondrienschwellung bzw.Zerfall der Cristae,Zylinderbildung im Lumen des Hauptstückes,das mit basalen Zelltrümmern und Folsäurekristallen ausgefüllt ist). Die Henleschen Schleifen,Mittel-und Verbindungsstücke und auch die Glomerula wiesen kaum nennenswerte Schädigungen auf.Beträchtlich ist auch die signifikante Erhöhung des Feucht-und Trockengewichtes der Niere.

BRADE und Mitarbeiter (12) deuten diese Nierenvergrößerung als Folge einer unspezifischen Wirkung mit Schädigung des Tubulusepithels und nicht - wie THRELFALL et al.(111) - als Ausdruck "chemischer Induktion".
Dem Umfang nach gilt die - verglichen mit anderen Schädigungen - besonders intensive RNS- und Proteinsynthese als für die Reaktion der Niere auf hochdosierte Pteridinapplikation charakteristisch (12,111).Bereits kurze Zeit nach Gabe von Folsäure (oder Derivaten) zeigt die Niere deutlich Zunahme bzw. Vermehrung der Ribosomen und deren Gruppierung zu Polysomen in den Tubulusepithelien des proximalen Nephronabschnittes (die Bildung von Polysomen erfolgt nach geltender Ansicht unter Mithilfe der m-RNS).
All diese Vorgänge lassen bereits frühzeitig die genetisch determinierte Umstellung des Funktionsstoffwechsels der Zelle auf den Proliferationsstoffwechsel erkennen.Daraus ergibt sich aber auch die besondere Eignung dieses Systems zum Nachweis von Noxen mit bevorzugter Wirkung auf den Proliferationsstoffwechsel.

3. Material und Methodik

3.1. Reagentien und Tiermaterial

3.1.1. Reagentien

1. Actinomycin D,krist.,rein,SERVA Nr.10710
2. Aethanol 96%,mit Petroläther vergällt
3. Chloroform DAB 6,MERCK Nr.2431
4. Desoxyribonucleinsäure,Na-Salz aus Kalbsthymus, hochmol.,mindestens 95% DNS,MG 8900000, N ca.14,4%,P ca.8%,EGA-Chemie KG,Steinheim
5. Diphenylamin,MERCK Nr.3086
6. Essigsäure 99 - 100% (Dichte etwa 1,05) p.A., MERCK Nr.90063
7. Folin-CIOCALTEU-Phenolreagens (1L = 1,22kg), MERCK Nr.9001
8. Folsäure (Pteroylmonoglutaminsäure), SERVA Nr.21700
9. γ-Globulin aus Rinderserum,lyophil.,rein, SERVA Nr.22490
10. HOSTACORTIN ® (Prednisolon),HÖCHST AG
11. Kaliumacetat reinst,MERCK Nr.4820
12. Kaliumnatriumtartrat,Seignettesalz,p.A., MERCK Nr.8087
13. Kupfer-(II)-sulfat,$CuSO_4 \cdot H_2O$,p.A., MERCK Nr.2790
14. Natriumcarbonat,wasserfrei,p.A., MERCK Nr.6392

15. Natriumchlorid,krist.,p.A.,MERCK Nr.6404
16. Natriumhydrogencarbonat (natrium bicarbonicum), MERCK Nr.6329
17. Natronlauge,TITRISOL® 0,1N,MERCK Nr.9959
18. Polyvinylsulfat (PVS),K-Salz,rein, SERVA Nr.33426
19. Puromycin,pharm.,aus streptomyces albo-niger, SERVA Nr.33835
20. Schwefelsäure,95-97% (D etwa 1,84) p.A., MERCK Nr.731
21. SP_{54}®(100mg Na-pentosanpolysulfuricum pro Ampulle),BENECHEMIE München/Solln
22. Trichloressigsäure (TCE),p.A.,MERCK Nr.807
23. 2,4,6-Triäthylenimino-1,3,5-triazin + Triethylene melamine substance® (TEM), LEDERLE LABORATORIES DIVISION, Pearl River N.Y. Nr.2075 J 7539

+ Für die Überlassung der Substanz sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

3.1.2. Tiermaterial

Die Untersuchungen erfolgten an ca. 650, 19 -23 g schweren weiblichen Albinomäusen aus institutseigener Zucht.

3.1.3. Fütterung der Versuchstiere

Die Mäuse wurden vor und während der Versuche mit ALTROMIN ® (Altrogge-Kraftfutter GmbH, Lage/Lippe) gefüttert. Futter und Wasser waren ad libitum verfügbar.

3.1.4. Behandlung der Tiere

3.1.4.1. Applikation von Folsäure

30, 60, 120 und 150mg Folsäure pro kg Körpergewicht (3.1.1.8.) wurden in 0,3 M Natriumhydrogencarbonatlösung gelöst (3.1.1.16.) und i.v. injiziert. Die Lösung wurde stets kurz vor der Injektion hergestellt.

3.1.4.2. Applikation von Actinomycin D, Puromycin, TEM, PVS, DNS, HOSTACORTIN ® und SP_{54} ®

Die oben genannten Substanzen (3.1.1.1, 18, 23, 19, 4, 10, 21.) wurden, den verschiedenen Dosierungen entsprechend, in steriler physiologischer Kochsalzlösung gelöst und langsam i.v. injiziert. Auch diese Lösungen wurden kurz vor ihrem Gebrauch frisch hergestellt.

3.1.4.3. Bestrahlung

Die Ganzkörperbestrahlung(GKB) von jeweils 4 Mäusen erfolgte in einem oben offenen,zylindrischen Glasgefäß (Durchmesser 15 cm,Höhe 18 cm) mit dem Kristalloflex 4 der Firma SIEMENS und HALSKE.

Technische Daten

Röhrenspannung	60 KV
Stromstärke	30 mA
HWS (Halbwertschicht)	0,16 mm Cu
Filterung	0,16 mm Cu
Abstand Fokus-Objekt	24 cm
Oberflächendosisleistung	65 R/min

Die Dauer der Bestrahlung richtete sich nach der Fragestellung und betrug 1,25 - 20 min.

3.1.5. Haltung der Tiere während der Versuche

Die behandelten und bestrahlten Tiere sowie die Kontrollen wurden in Gruppen von 4 - 5 Stück in Glaszylindern (Durchmesser 20 cm,Höhe 20 cm)bei Zimmertemperatur gehalten.

3.1.6. Aufarbeitung der Tiere

Vor Aufarbeitung wurden die Mäuse gewogen und anschließend in oberflächlicher Chloroformnarkose (3.1.1.3.)

dekapitiert.Unmittelbar nach der Ausblutung wurden die Nieren entnommen.

3.1.7. Behandlung der Nieren

Nach Entfernung der Nierenkapsel wurden die Nieren in frischem Zustand gewogen und in physiologischer Kochsalzlösung (Verdünnung 1:10) 3 min bei ca. 25 - 30000 U/min unter Kühlung homogenisiert (Homogenisator der Fa.BÜHLER,Tübingen).Verwendet wurde ein 4-Flügelmesser,Durchmesser 18 mm,und ein 25 ml fassendes Glasgefäß der gleichen Firma.

3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

3.2.1. Prinzip

Der Proteingehalt wurde mit dem Folin-CIOCALTEU-Reagens(3.1.1.7.) nach LOWRY und Mitarbeitern(74)ermittelt.

3.2.2. Lösungen

A Na_2CO_3 (3.1.1.14.): 2%ig in 0,1 N NaOH (3.1.1.17.)

B $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (3.1.1.13.): 0,5%ig in 1%iger wässriger Kaliumnatriumtartratlösung (3.1.1.12.)

C Mischung aus 50 ml der Lösung A und 1 ml der Lösung B

D Folin-CIOCALTEU-Reagens (3.1.1.7.)

Dieses Reagens mußte zuerst in seiner Säureäquivalenz auf 1 N eingestellt werden. Deshalb wurden 2 ml Reagens mit 1 N NaOH in Gegenwart von Phenolphthalein bis zum Farbumschlag titriert. Der durchschnittliche NaOH-Verbrauch betrug 5,72 ml. Dementsprechend wurde 1 ml des Reagens mit 2,86 ml dest. Wasser verdünnt.

3.2.3. Ausführung

0,1 ml der im Verhältnis 1:1000 verdünnten Nierenhomogenate wurden in Zentrifugengläsern mit 1 ml des Reagens C versetzt und sorgfältig gemischt. 15 min später wurde dieser Ansatz innerhalb 1 bis 2 sec. mit 0,1 ml des Folin-CIOCALTEU-Reagens intensiv vermischt und (nach mindestens 30 min. Aufbewahrung bei Zimmertemperatur) bei 750 mμ gegen den proteinfreien Reagentien-Leerwert in 0,5 cm-Glasküvetten photometriert. Der Reagentien-Leerwert enthielt anstelle des Proteinzusatzes 0,1 ml dest. Wasser.

3.3. Messung der Konzentration von DNS und säurelösl. DNS-Teilprodukten (Desoxy-Verbindungen)

3.3.1. Prinzip

In Anlehnung an die Methoden von SCHNEIDER(95)und ZAMENHOF(127)werden die Nucleinsäuren aus dem Organhomogenat mit kalter, 6%iger TCE gefällt. Im Überstand verbleiben u.a. die nicht fällbaren DNS-Bestandteile.

Aus dem Sediment werden die Nucleinsäuren durch 20 min Erhitzen in 10%iger TCE bei 90°C extrahiert und colorimetrisch differenziert.

3.3.2. Lösungen

TCE (3.1.1.22.): 6%ig und 10%ig in Aqua dest.
Diphenylamin-Reagens (DISCHE-Reagens): 100 ml einer 1%igen Lösung von Diphenylamin (3.1.1.5.) in Eisessig (3.1.1.6.)wurden mit 2,5 ml Schwefelsäure (3.1.1.20.) versetzt.Das Reagens wurde im Kühlschrank aufbewahrt.
Kaliumacetat (3.1.1.11.): 10%ig in Äthanol (3.1.1.2.)

3.3.3. Ausführung

2 ml des 1:50 verdünnten Nierenhomogenates wurden mit 4 ml kalter,6%iger TCE-Lösung versetzt und 15 min.in die Tiefkühltruhe verbracht.Die anschließende 20 min dauernde Zentrifugation bei 6000 U/min lieferte den "Überstand I".Dieser wurde dekantiert und das verbleibende Sediment in 2 ml 10% Kaliumacetat enthaltendem, 96%igem Aethanol gewaschen.Anschließend wurde das Sediment in 4 ml 10%iger TCE resuspendiert und 20 min bei 90°C im Wasserbad belassen.Nach 30 min Kühlung in der Tiefkühltrune bei -15°C wurden die Proben erneut 20 min bei 6000 U/min zentrifugiert und der klare Überstand als "Überstand II"dekantiert.Jeweils 1 ml der Überstände I u.II wurden der DISCHE-Reaktion unterworfen u. in 1 cm-Glasküvetten bei 600 und 630 mμ photometriert.

DISCHE-Reaktion: 1 ml des klaren Überstandes wurde mit 2 ml Diphenylamin-Reagens versetzt und 20 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach 20 min Abkühlung bei Zimmertemperatur (unter Vermeidung direkten Lichteinfalls) wurde die Extinktion der Proben bei 600 u. 650 mμ (Spektralphotometer PMQ II der Fa. C. ZEISS, Stuttgart-Oberkochen) in 1 cm-Glasküvetten gegen ein von DNS-Abbauprodukten freies, gleichbehandeltes Vergleichsgemisch aus 1 ml Aqua dest. und 2 ml Diphenylamin-Reagens gemessen.

3.4. Weitere methodische Hinweise

3.4.1. Fehlerberechnung

Die Streuung der Einzelwerte einer Gruppe um das Gruppenmittel wurde nach folgender Formel berechnet:

$$Sx = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$ errechnet.

Erläuterung der Indices:

Sx = Standardabweichung

$\bar{x}$ = arithmetisches Mittel der Stichproben

x_i = Einzelwerte der Stichproben

n = Anzahl der Stichproben

3.4.2. Signifikanzanalyse

a) Varianz-Differenz

$$s_{Diff.} = \sqrt{\frac{\sum (x_i' - \bar{x}')^2 + \sum (x_i'' - \bar{x}'')^2}{n' + n'' - 2} \cdot \frac{n' + n''}{n' \cdot n''}}$$

Erläuterung der Indices:

$s_{Diff.}$ = Varianz-Differenz

x_i' bzw. x_i'' = Einzelwerte zweier Versuchsreihen

$\bar{x}'$ bzw. $\bar{x}''$ = arithmetisches Mittel der jeweiligen Einzelwerte zweier Versuchsreihen

n' bzw. n'' = Anzahl der Einzeltiere zweier Versuchsreihen

b) Testgröße

$$t = \frac{\bar{x}' - \bar{x}''}{s_{Diff.}}$$

Erläuterung der Indices:

t = Testgröße

$\bar{x}'$ bzw. $\bar{x}''$ = arithmetisches Mittel der jeweiligen Einzelwerte zweier Versuchsreihen

$s_{Diff.}$ = Varianz-Differenz

c) Freiheitsgrad

$FG = n' + n'' - 2$

Erläuterung der Indices:

FG = Freiheitsgrad

n' bzw. n'' = Anzahl der Einzeltiere zweier Versuchsreihen

d) Bestimmung der Zufallswahrscheinlichkeit

Aus der Testgröße t ergibt sich in Abhängigkeit von den Freiheitsgraden eine bestimmte Zufallswahrscheinlichkeit p (Burn).

Die Zufallswahrscheinlichkeit entspricht dabei:

z.B. bei p = 0,5 : bis 50%; 0,1 : bis 10%;

0,05 : bis 5% und 0,01 : bis 1%.Eine Zufallswahrscheinlichkeit kleiner als 0,05(=5%) gilt als signifikant.

4. Ergebnisse

4.1. Zur Reaktion der Niere auf hohe Folsäuredosen

4.1.1. Überblick

Aus dem Vergleich aller vorliegend gemessenen Veränderungen der Niere nach Folsäuregabe in Abhängigkeit von Versuchszeitpunkt und Dosis ergibt sich, daß die Reaktionsbereitschaft in der Reihenfolge - Rel. Frischgewicht - Proteingehalt - DNS-Gehalt - abnimmt. Protein- und DNS-Gehalt veränderten sich im allgemeinen später und erst nach höheren Folsäure-Dosen als das Organgewicht. Letzteres zeigte unter den gewählten Bedingungen als einziges deutliche Dosisabhängigkeit.
Hohe Folsäure-Dosen bedingten im allgemeinen eine homogenere Organ-Reaktion als geringere Dosen. Dies ergibt sich u.a. aus dem Vergleich der Standardabweichungen.

4.1.2. Relatives Frischgewicht

Bereits 12 Stunden nach Gabe von 30mg Folsäure/kg K.-Gew. hatte sich das relative Frischgewicht der Niere zugleich signifikant und maximal erhöht. Unter dem Einfluß höherer Folsäuredosen erschienen die Reaktionsmaxima im allgemeinen erst nach 24 Stunden. Mit einem durchschnittlichen prozentualen Gewichtszuwachs von

(rd.) 30, 50, 70 bzw. 90% im jeweiligen Reaktionsmaximum verhielt sich die Reaktion des Nierengewichtes auf Folsäuregaben deutlich dosisabhängig. Zu besonders steilem Gewichtsanstieg kam es nach höheren Folsäure-Dosen. Die Regression der Gewichtsveränderungen erfolgte verhältnismäßig langsam. Sie umfaßte unter dem Einfluß der geringsten Folsäure-Dosis den gesamten, viertägigen Versuchszeitraum, nach Gabe höherer Folsäure-Dosen einen wesentlich längeren Zeitraum. (Abb. 1-5)

4.1.3. Proteingehalt

60mg Folsäure/kg K.-Gew. waren notwendig, um den Proteingehalt der Niere signifikant zu erhöhen. Die Maximalveränderungen waren hier beiderseits nur undeutlich von den Nachbarwerten abgrenzbar und zeigten sich durchweg binnen 48-72 Stunden. Zu Normalisierung innerhalb des viertägigen Versuchszeitraumes kam es nur unter dem Einfluß mittlerer Folsäure-Dosen. (Abb. 1-5)

4.1.4. DNS-Gehalt

Zur Auslösung eines signifikanten Anstieges des DNS-Gehaltes der Niere waren Folsäure-Dosen von mindestens 120mg/kg erforderlich. Die Reaktionsmaxima erschienen auch hier binnen 48-72 Std. Die Veränderungen hielten über den gewählten Versuchszeitraum hinaus an. Seinem Umfang nach vergrößerte sich der DNS-Gehalt nach Gabe von 120mg Folsäure stärker als unter dem Einfluß der um 25% höheren Dosis. (Abb. 1-5)

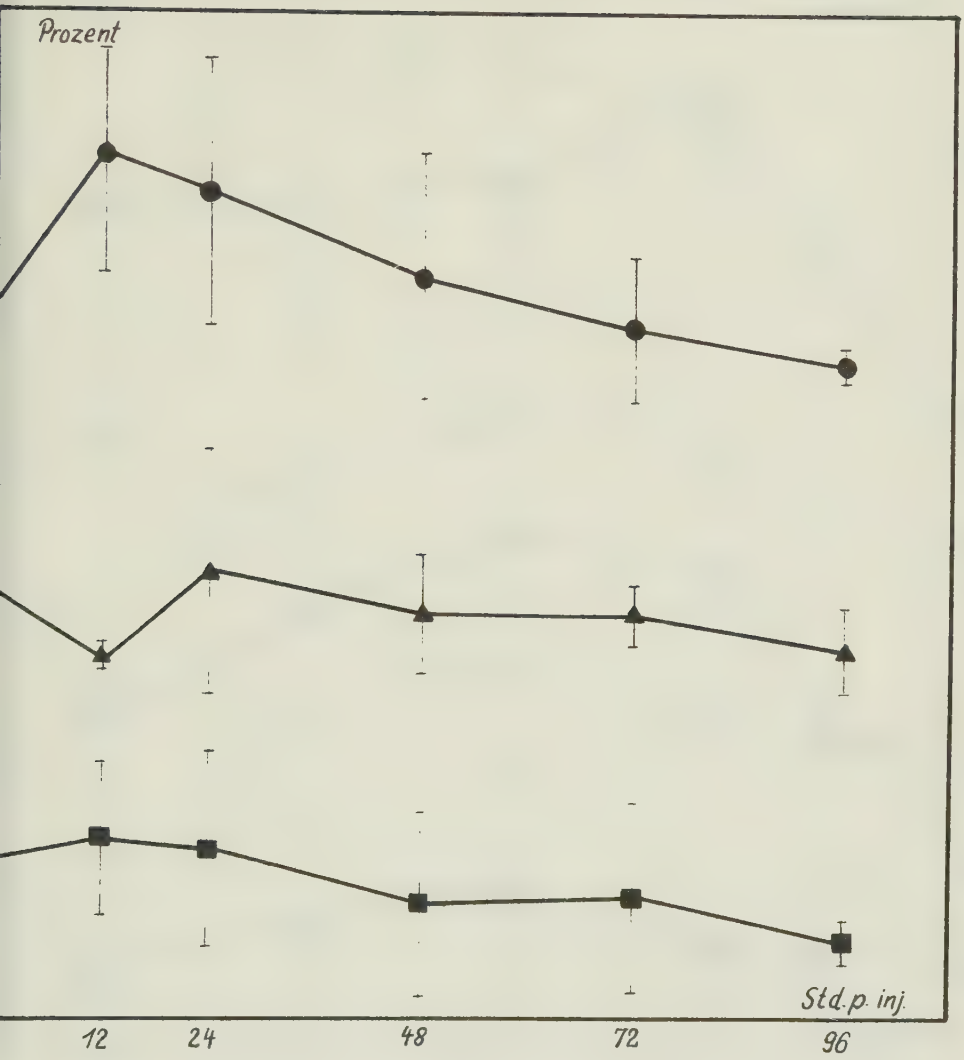


Abb.1: Rel.Frischgewicht,Protein-und DNS-Gehalt der Niere der Maus unter dem Einfluß von 30mg Folsäure/kg K.-Gew.

Kennzeichnung der Kurven:

Punkt:Rel.Frischgewicht in %

Dreieck:Proteingehalt in %

Quadrat:DNS-Gehalt in

n=4-8 (Einzelnieren)

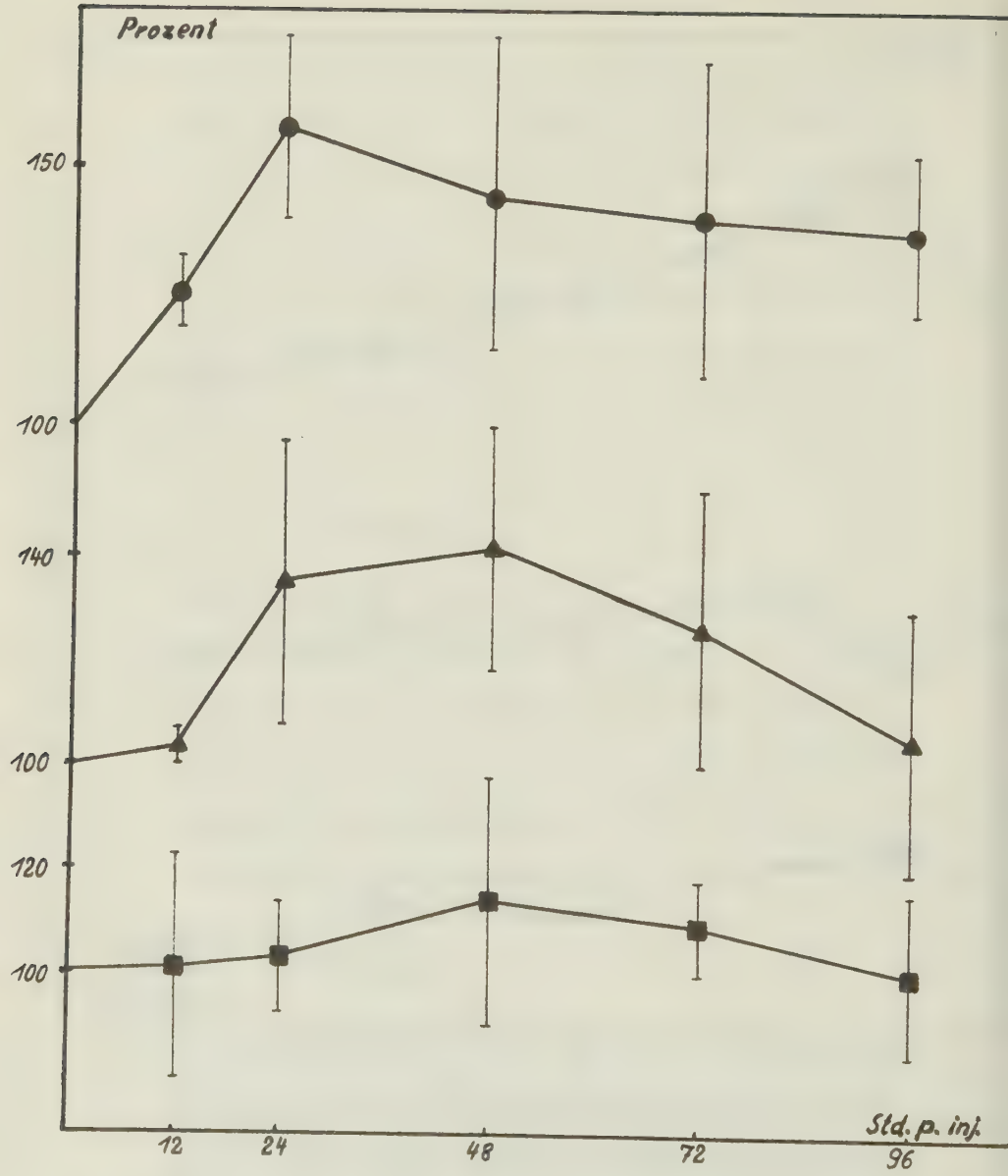


Abb.2: Rel.Frischgewicht,Protein-und DNS-Gehalt der Niere der Maus unter dem Einfluß von 60mg Folsäure/kg K.-Gew.

Kennzeichnung der Kurven:

Punkt:Rel.Frischgew.in %; Quadrat:DNS-Gehalt in %

Dreieck:Proteingehalt in %; n=4-8 (Einzelnieren)

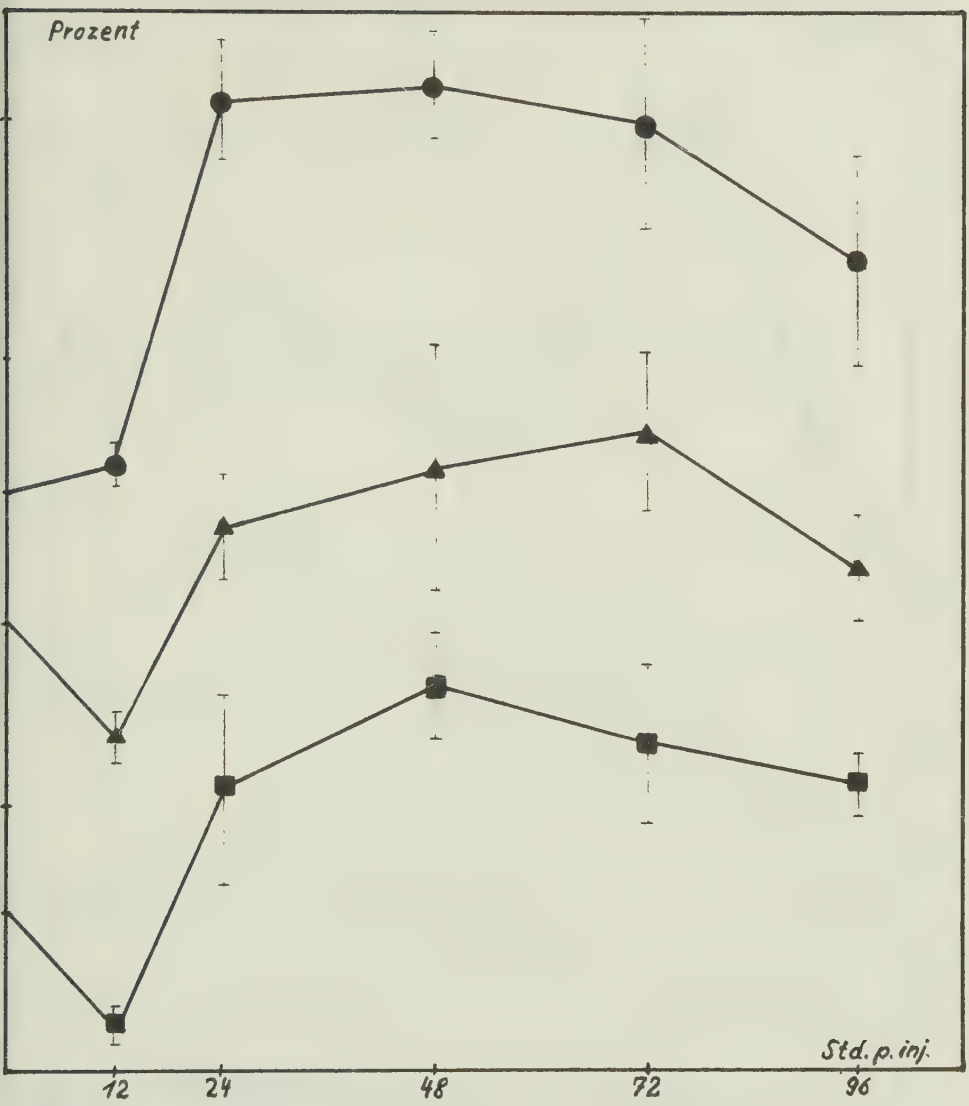


Abb.3: Rel.Frischgewicht,Protein-und DNS-Gehalt der Niere der Maus unter dem Einfluß von 120mg Folsäure/kg K.-Gew.

Kennzeichnung der Kurven:

Punkt: rel.Frischgew.in %; Quadrat:DNS-Gehalt in %

Dreieck:Proteingehalt in %; n=4-8 (Einzelnieren)

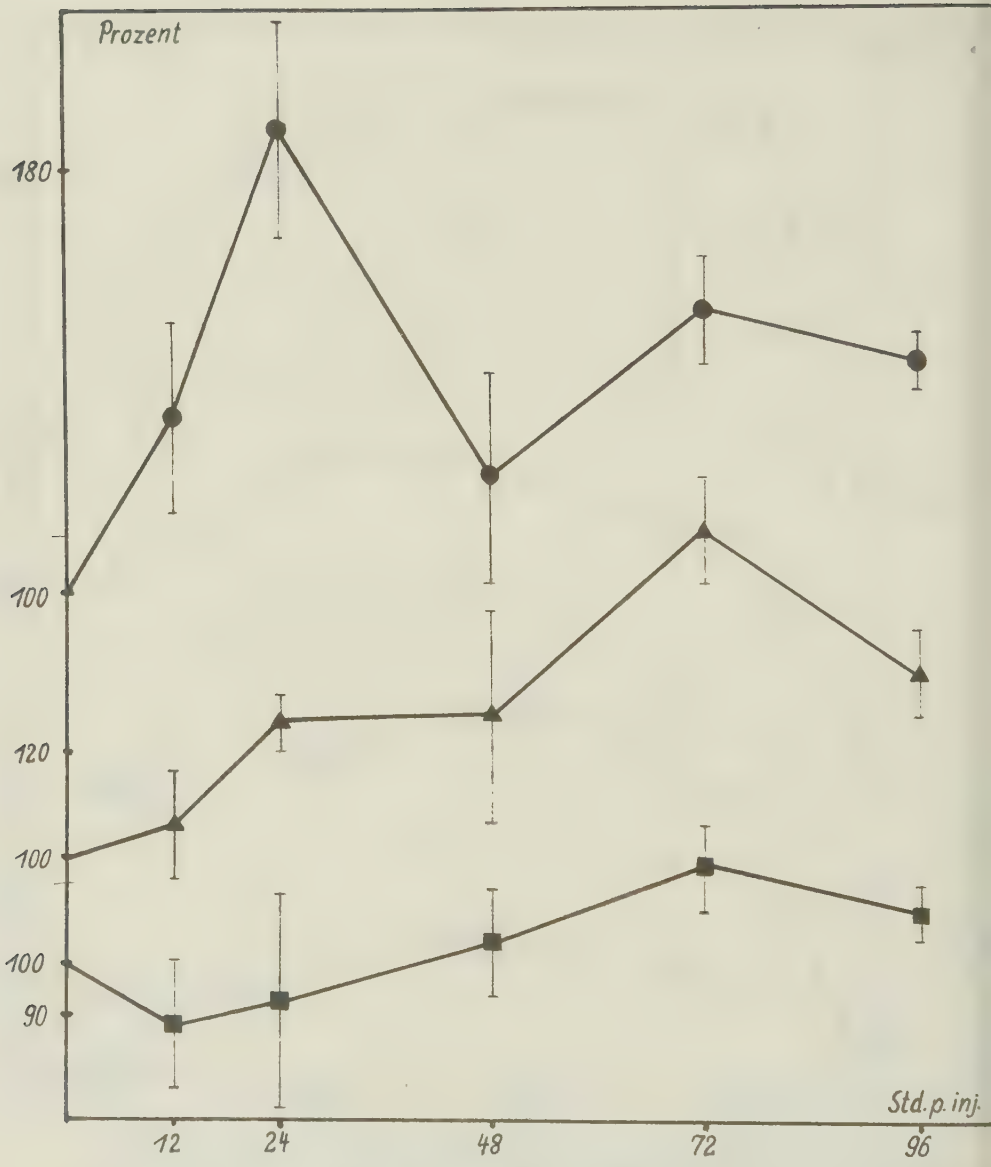


Abb.4: Rel.Frischgewicht, Protein-und DNS-Gehalt der Niere der Maus unter dem Einfluß von 150mg Folsäure/kg K.-Gew.

Kennzeichnung der Kurven:

Punkt: Rel.Frischgew.in %; Quadrat: DNS-Gehalt in %

Dreieck: Proteingehalt in %; n=4-8 (Einzelnieren)

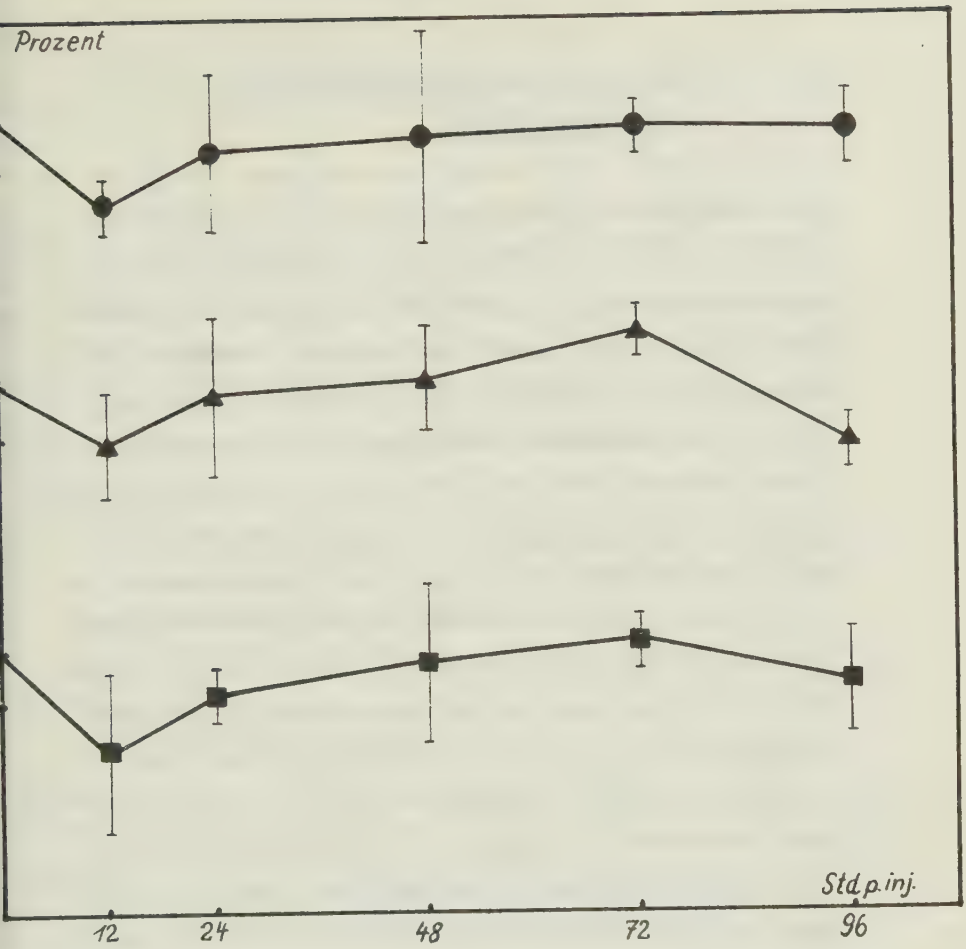


Abb.5: Rel.Frischgewicht,Protein-und DNS-Gehalt der Niere der Maus.Kontrollkurven.

Kennzeichnung der Kurven:

Punkt:Rel.Frischgewicht in %

Dreieck:Proteingehalt in %

Quadrat:DNS-Gehalt in %

n=4-8 (Einzelnieren)

4.2. Zur Hemmung der Folsäurereaktion (Dosisabhängigkeit)

Die nachstehend mitgeteilten Untersuchungen hatten vor allem o r i e n t i e r e n d e n Charakter.Sie sollten Aufschluß über die günstigste Dosis und den passendsten Applikationszeitpunkt von Noxen mit hemmender Einwirkung auf die Entwicklung der Folsäure-Reaktion der Niere geben.Angesichts des Umfanges der dazu erforderlichen Analysen wurde zu diesem Zweck lediglich der Gruppendurchschnitt experimentell ermittelt.Der statistischen Analyse lagen die in Teil I der Untersuchungen ermittelten durchschnittlichen Variationskoeffizienten (Tab.I) zugrunde.Die Bewertung der Signifikanz ist dabei umso kritischer,als sich die angegebenen Variationskoeffizienten auf E i n z e l n i e r e n (und nicht auf ein Nierenpaar) beziehen,und als bei dem statistischen Vergleich der Gruppen mit dem "t-Test" jeweils gleiche Gruppenstärken eingesetzt sind (obwohl die Wirkung von 150mg Folsäure/kg auf die Niere der Maus zum gewünschten Versuchszeitpunkt -3.Tag p.i.- schließlich rd.20 Tiere umfaßte).

Folgende Bedingungen gelten für die nächsten Versuche:
Folsäure-Dosis: 150mg / kg Körpergewicht
Aufarbeitung der Tiere: 72 Stunden nach Folsäureinjektion

	Rel.Frischgew.		Proteingehalt		DNS-Gehalt	
	$\bar{x}$	Sx	$\bar{x}$	Sx	$\bar{x}$	Sx
1	15,6	±7,5	9,7	±7,3	14,0	±5,4
2	16,3	±9,4	18,6	±9,5	15,7	±6,8
3	8,7	±4,6	10,4	±4,5	8,2	±4,8
4	10,3	±5,1	8,0	±4,7	11,0	±6,3

Tabelle I:

Durchschnittliche Variations-Koeffizienten von Rel.Frischgewicht, Protein-und DNS-Gehalt der Nieren von Mäusen unter dem Einfluß hoher Folsäure-Dosen.
n = 5 Gruppen zu 8 Nieren.

Zeile 1:

30mg Folsäure/kg K.-Gewicht

Zeile 2:

60mg Folsäure/kg K.-Gewicht

Zeile 3:

120mg Folsäure/kg K.-Gewicht

Zeile 4:

150mg Folsäure/kg K.-Gewicht

$\bar{x}$: arithmetisches Mittel der Stichproben

Sx: Standardabweichung

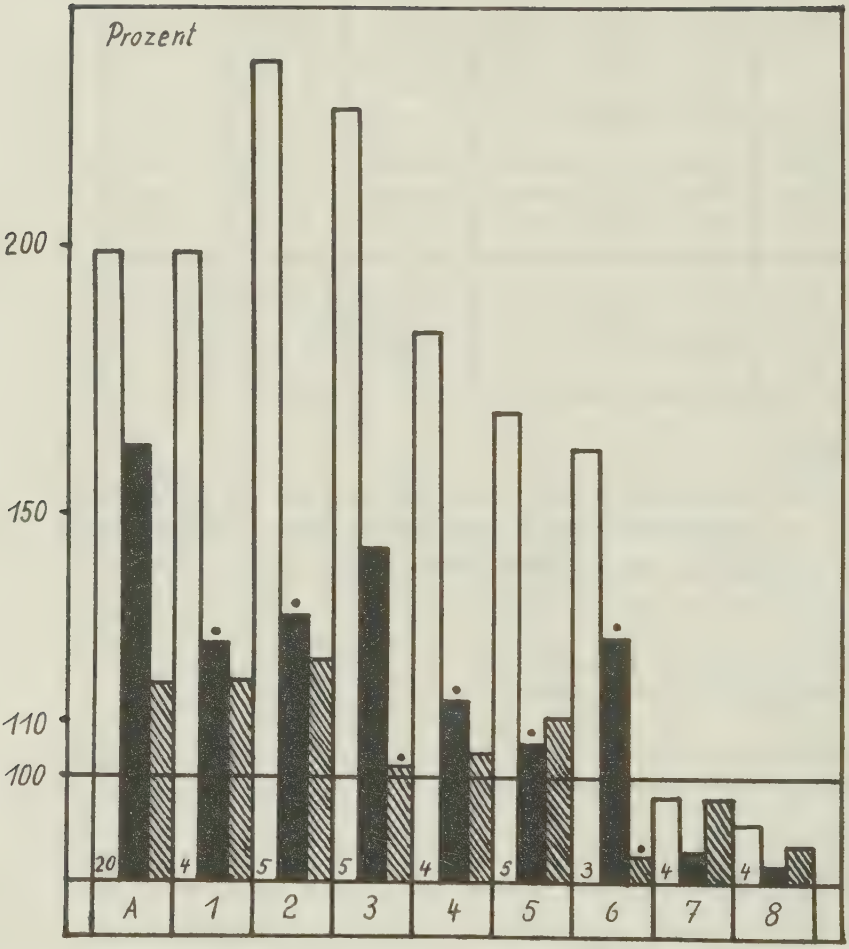


Abb.6: Zur Wirkung von Actinomycin D auf die Folsäurereaktion der Niere der Maus.

Kennzeichnung der Säulen:

n : Rel. Frischgewicht; n = Anzahl der Tiere

: Proteingehalt

: DNS-Gehalt

•: $p < 0,05$

Kennzeichnung der Säulengruppen:

A:Werte 3 Tage nach i.v.Injektion von
150mg Folsäure/kg K.-Gewicht

1: 0,2mg Act.D/kg K.-Gew.unmittelbar nach Folsäuregabe

2: 0,1mg Act.D/kg K.-Gew.unmittelbar nach Folsäuregabe

3: 0,1mg Act.D/kg K.-Gew. 6 Std nach Folsäuregabe

4: 0,05mg Act.D/kg K.-Gew.unmittelbar nach Fols.-Gabe

5: 0,025mg Act.D/kg K.-Gew.unmittelbar nach Fols.-Gabe

6: 0,0125mg Act.D/kg K.-Gew.unmittelbar nach Fols.-Gabe

7: 0,2mg Act.D/kg K.-Gew.

8: 0,1mg Act.D/kg K.-Gew.

4.2.1. Actinomycin D

Kleine Actinomycindosen(0,05mg,0,025mg und 0,0125mg), unmittelbar nach Folsäure injiziert,führten zu einer Verminderung des Proteingehaltes um 35 - 55% im Vergleich zu reinen Folsäurekontrolltieren(Abb.6).Das relative Frischgewicht verminderte sich unter den gleichen Bedingungen um 15 - 35% und der DNS-Gehalt um maximal 32%(Säulengruppen 4,5 und 6).Actinomycindosen von 0,1 und 0,2mg/kg K.-Gewicht verminderten zwar den Proteingehalt um ca.30%,ließen aber das relative Frischgewicht und den DNS-Gehalt im wesentlichen unbeeinflußt(Säulengruppen 1 und 2).Wurde Actinomycin D in Dosen von 0,1mg pro kg K.-Gew. 6 Std nach der Folsäure injiziert,verminderten sich Protein- und DNS-Gehalt um ca. 15%.

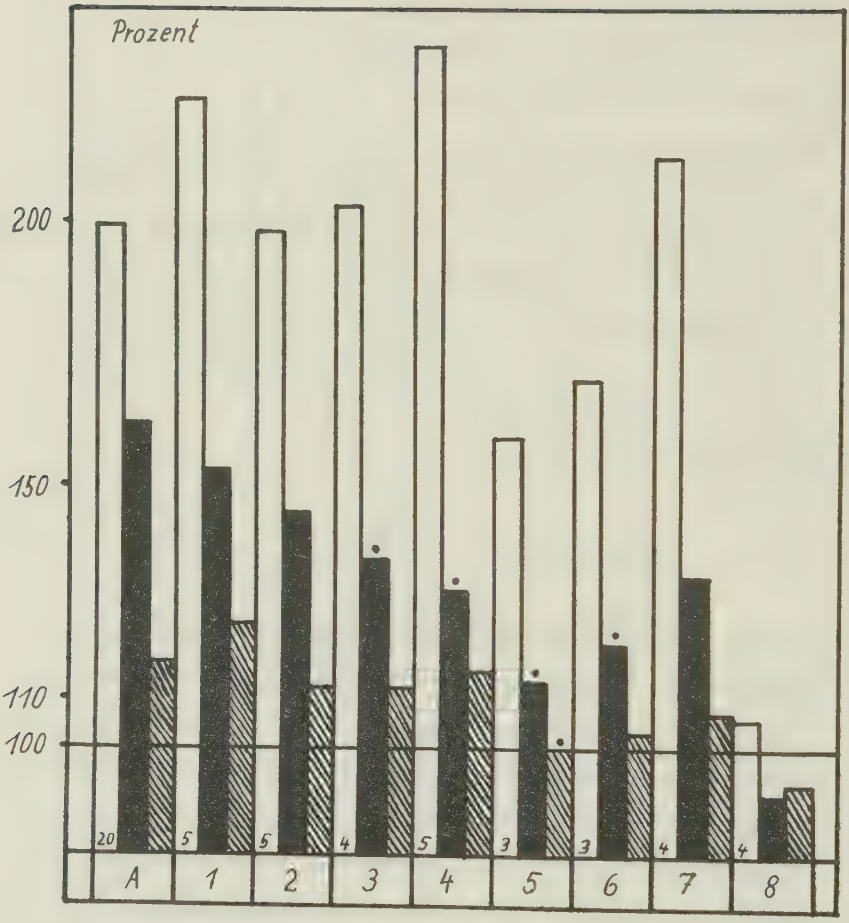


Abb.7: Zur Wirkung von Puromycin auf die Folsäurereaktion der Niere der Maus

Kennzeichnung der Säulen:

□: Rel. Frischgewicht

■: Proteingehalt

▨: DNS-Gehalt

Kennzeichnung der Säulengruppen:

A:Werte 3 Tage nach i.v.Injektion von 150mg Folsäure/kg K.-Gew.

1: 4,0mg Pur./kg K.-Gew. unmittelbar nach Fols.-Gabe

2: 2,0mg Pur./kg K.-Gew. unmittelbar nach Fols.-Gabe

3: 1,0mg Pur./kg K.-Gew. unmittelbar nach Fols.-Gabe

4: 1,0mg Pur./kg K.-Gew. 6 Std.nach Fols.-Gabe

5: 0,5mg Pur./kg K.-Gew. unmittelbar nach Fols.-Gabe

6: 0,25mg Pur./kg K.-Gew. unmittelbar nach Fols.-Gabe

7: 0,125mg Pur./kg K.-Gew. unmittelbar nach Fols.-Gabe

8: 1,0mg Pur./kg K.-Gew.

4.2.2. Puromycin

Auch durch Puromycin ist die Reaktion der Niere auf Folsäure beeinflußbar,wobei sich hinsichtlich der Dosisabhängigkeit ähnliche Verhältnisse ergeben wie bei Actinomycin D:Wurde Puromycin unmittelbar nach Folsäure-Injektion appliziert,hatten Dosen von 0,5mg sowohl gegenüber dem Protein- als auch gegenüber dem DNS-Gehalt den deutlichsten Effekt.Protein- bzw.DNS-Gehalt blieben hier rund 50 bzw.17% hinter den Folsäure-Kontrollen zurück(Säulengruppen 1,2,3,4,5 in Abb.7).Betrugen die Puromycindosen $>$ 0,5mg,nahm ihre Wirkung auf den Proteingehalt dosisproportional ab.Wurde Puromycin in Dosen $<$ 0,5mg injiziert,verminderte sich seine Wirkung mit fallender Dosis (Säulengruppen 6 und 7).

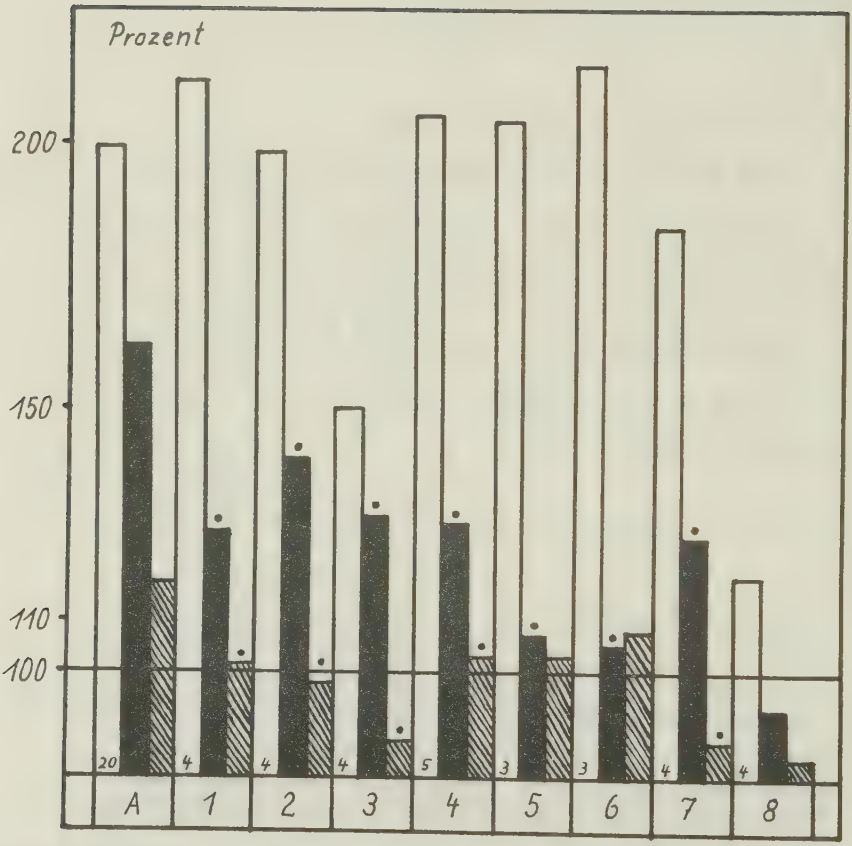


Abb.8: Zur Wirkung von TEM auf die Folsäurereaktion der Niere der Maus.

Kennzeichnung der Säulen:

□: Rel. Frischgewicht

■: Proteingehalt

▨: DNS-Gehalt

Kennzeichnung der Säulengruppen:

A:Werte 3 Tage nach i.v.Injektion von
150mg Folsäure/kg K.-Gew.

1: 1,0mg TEM/kg K.-Gew. unmittelbar nach Fols.-Gabe

2: 1,0mg TEM/kg K.-Gew. 24 Std. nach Fols.-Gabe

3: 1,0mg TEM/kg K.-Gew. 6 Std. vor Fols.-Gabe

4: 0,5mg TEM/kg K.-Gew. unmittelbar nach Fols.-Gabe

5: 0,25mg TEM/kg K.-Gew. unmittelbar nach Fols.-Gabe

6: 0,125mg TEM/kg K.-Gew. unmittelbar nach Fols.-Gabe

7: 0,06mg TEM/kg K.-Gew. unmittelbar nach Fols.-Gabe

8: 1,0mg TEM/kg K.-Gew.

4.2.3. Triäthylenmelamin® (TEM)

Unter dem Einfluß von TEM blieb vor allem der DNS-Gehalt der durch Folsäure geschädigten Niere hinter den Vergleichswerten zurück.Die deutlichste Wirkung hatte eine Dosis von 1,0mg,sobald sie6 Stunden vor der Folsäure gegeben wurde.Durch TEM in Dosen von 0,25mg und 0,125mg/kg wurde der Folsäure-induzierte Anstieg des Proteingehaltes praktisch aufgehoben.Höhere Dosen waren schwächer wirksam.Zu einem Einfluß auf das Organgewicht kam es nicht.(Abb.8)

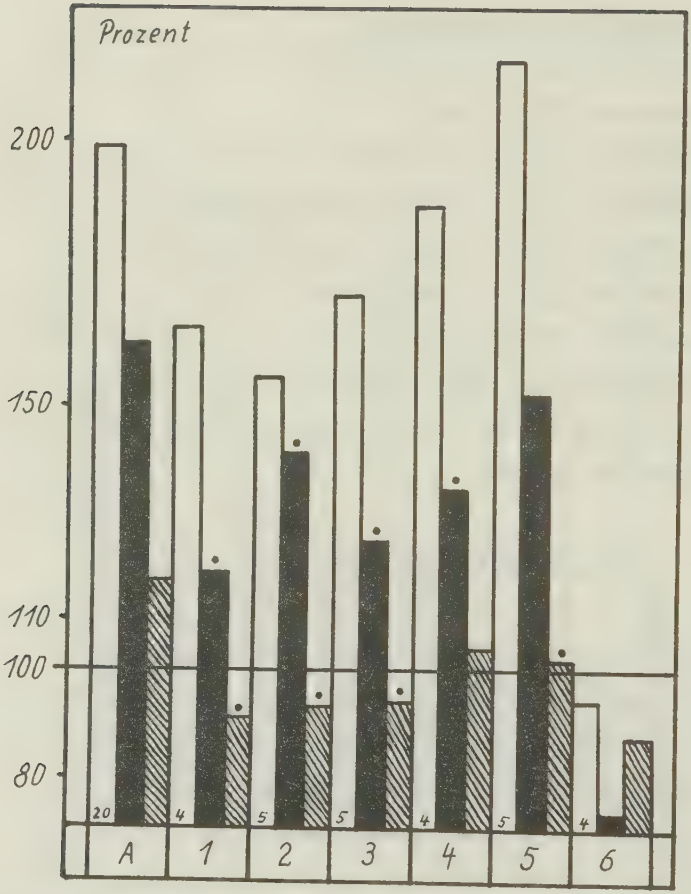


Abb.9: Zur Wirkung von Röntgenstrahlen (GKB) auf die Folsäurereaktion der Niere der Maus.

Kennzeichnung der Säulen:

□: Rel. Frischgewicht

■: Proteingehalt

▨: DNS-Gehalt

Kennzeichnung der Säulengruppen:

A:Werte 3 Tage nach i.v.Injektion von
150mg Folsäure/kg K.-Gewicht

1: 1300 R unmittelbar nach Folsäuregabe

2: 650 R unmittelbar nach Folsäuregabe

3: 325 R unmittelbar nach Folsäuregabe

4: 162 R unmittelbar nach Folsäuregabe

5: 81 R unmittelbar nach Folsäuregabe

6: 81 R

4.2.4. Ganzkörperbestrahlung (GKB)

Durch GKB der durch Folsäure geschädigten Mäuse mit Dosen von 1300 - 81 R wurde der Anstieg von Organgewicht, Protein- und DNS-Gehalt der Nieren beeinflußt.Letzterer wurde durch Dosen von 325 - 1300 R praktisch aufgehoben.Weniger ausgeprägt waren die Wirkungen auf den Proteingehalt.Wurde erst 24 Stunden nach Folsäuregabe bestrahlt,war die Wirkung auf die Folsäurehyperplasie geringer.Gegenüber dem Anstieg des DNS-Gehaltes waren noch Strahlendosen von rd.80 R wirksam.Diese ließen den Proteingehalt unbeeinflußt.

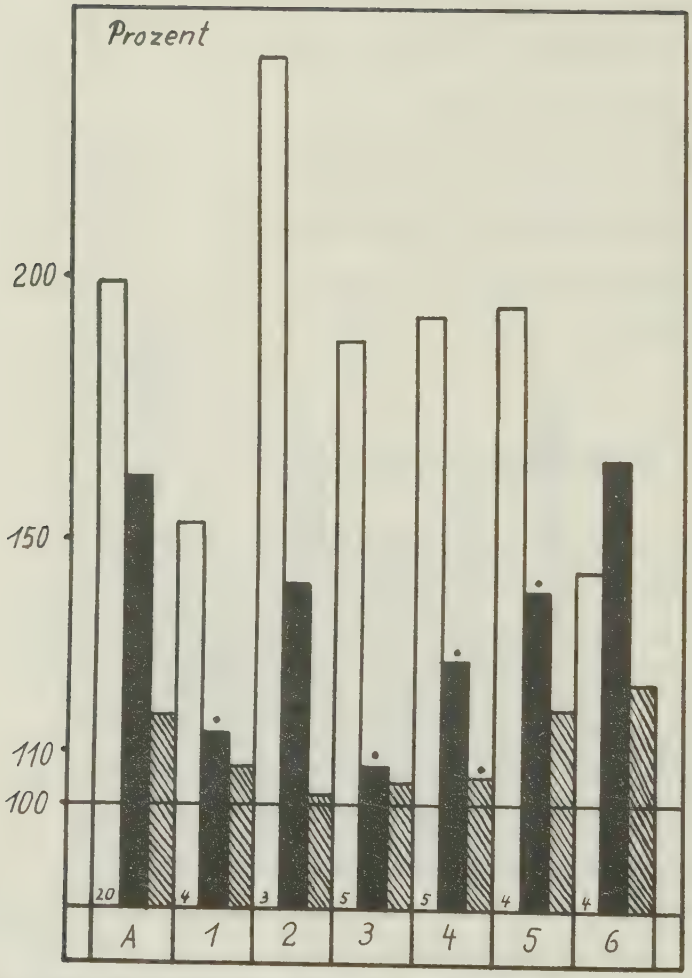


Abb.10: Zur Wirkung von PVS auf die Folsäurereaktion der Niere der Maus.

Kennzeichnung der Säulen:

□: Rel.Frischgewicht

■: Proteingehalt

▨: DNS-Gehalt

Kennzeichnung der Säulengruppen:

A: Werte 3 Tage nach i.v.Injektion von
150mg Folsäure/kg K.-Gew.

1: 75mg PVS/kg K.-Gew. 6 Std.vor Folsäuregabe

2: 50mg PVS/kg K.-Gew. 6 Std.vor Folsäuregabe

3: 25mg PVS/kg K.-Gew. unmittelbar nach Fols.-Gabe

4: 12,5mg PVS/kg K.-Gew. 6 Std.vor Folsäuregabe

5: 50mg PVS/kg K.-Gew. 6 Std.nach Folsäuregabe

6: 50mg PVS/kg K.-Gew.

4.2.5. Polyvinylsulfat (PVS)

Auch durch vorherige oder gleichzeitige Gabe von PVS wird die Folsäure-induzierte Nierenhyperplasie gehemmt. Von dieser Hemmung werden Protein- und DNS-Gehalt in etwa gleichem Umfang erfaßt.Besonders wirksam waren PVS-Dosen von 25 - 75mg/kg.Die Wirkung von PVS ist um so bemerkenswerter,als die Substanz,allein gegeben,unter den Bedingungen des Versuchs gleichfalls zu einer hyperplastischen Reaktion der Niere führt(Abb.10).

4.2.6. Desoxyribonucleinsäure (DNS)

Einen gegenüber dem PVS anderen Wirkungstyp zeigt hochmolekulare Kalbsthymus-DNS (Abb.11).In Dosen von 12,5 - 50mg/kg allein gegeben,verminderte die DNS den Protein- und DNS-Gehalt der Niere.Der durch Folsäure-Gabe induzierte Anstieg des Proteingehaltes wurde durch DNS-Do-

sen von 6,25 - 25mg/kg gehemmt.Höhere Dosen blieben ohne Wirkung.

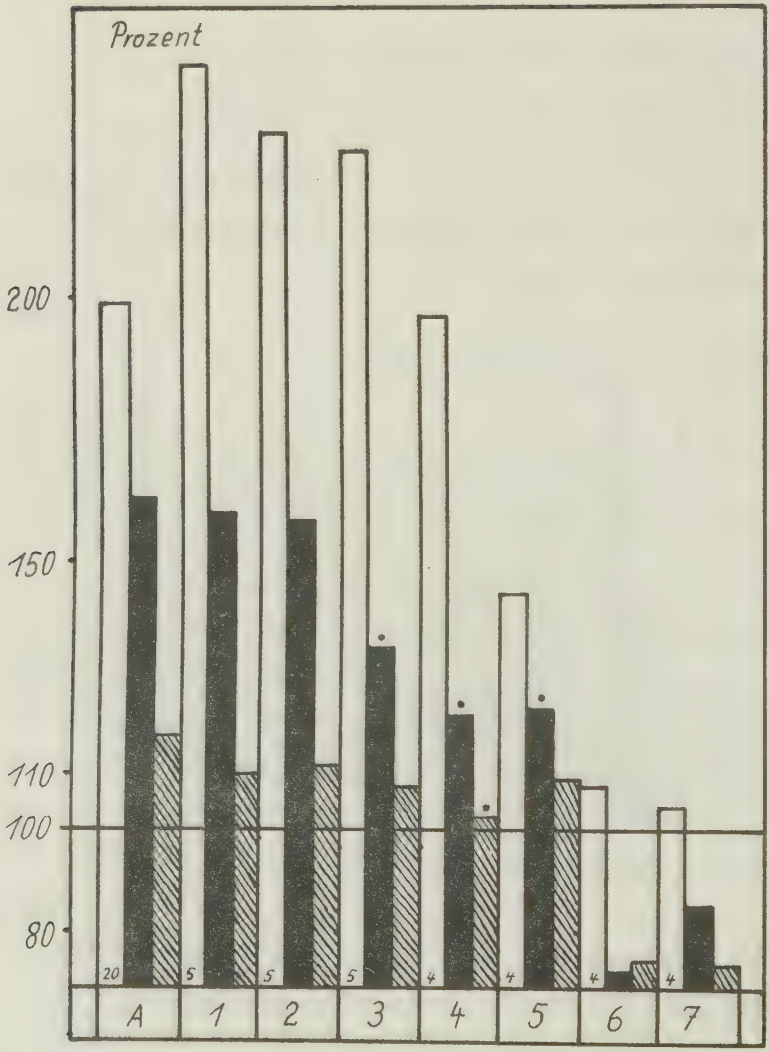


Abb.11: Zur Wirkung von DNS auf die Folsäurereaktion der Niere der Maus.

Kennzeichnung der Säulen:

□: Rel. Frischgewicht

■: Proteingehalt

▨: DNS-Gehalt

Kennzeichnung der Säulengruppen:

A: Werte 3 Tage nach i.v. Injektion von
150mg Folsäure/kg K.-Gew.

1: 50mg DNS/kg K.-Gew. unmittelbar nach Fols.-Gabe

2: 50mg DNS/kg K.-Gew. 6 Std. vor Folsäure-Gabe

3: 25mg DNS/kg K.-Gew. 6 Std. vor Folsäure-Gabe

4: 12,5mg DNS/kg K.-Gew. 6 Std. vor Folsäure-Gabe

5: 6,25mg DNS/kg K.-Gew. unmittelbar nach Fols.-Gabe

6: 50mg DNS/kg K.-Gew.

7: 12,5mg DNS/kg K.-Gew.

4.2.7. Hydrocortison

Wie sich aus den in dem Diagramm dargestellten Befunden ergibt, ließ sich die durch Folsäure ausgelöste Nierenhyperplasie auch durch Prednisolon hemmen. Hier schien der Proteingehalt im allgemeinen stärker betroffen als der DNS-Gehalt. Eine verwertbare Dosisabhängigkeit dieser Hemmwirkung zeigte sich nicht (Abb.12).
(Es wurde hier das Prednisolon "Hostacortin ® " verwendet; 1 mg Hostacortin ® ≙ 4 mg Hydrocortison wirkungsmäßig)

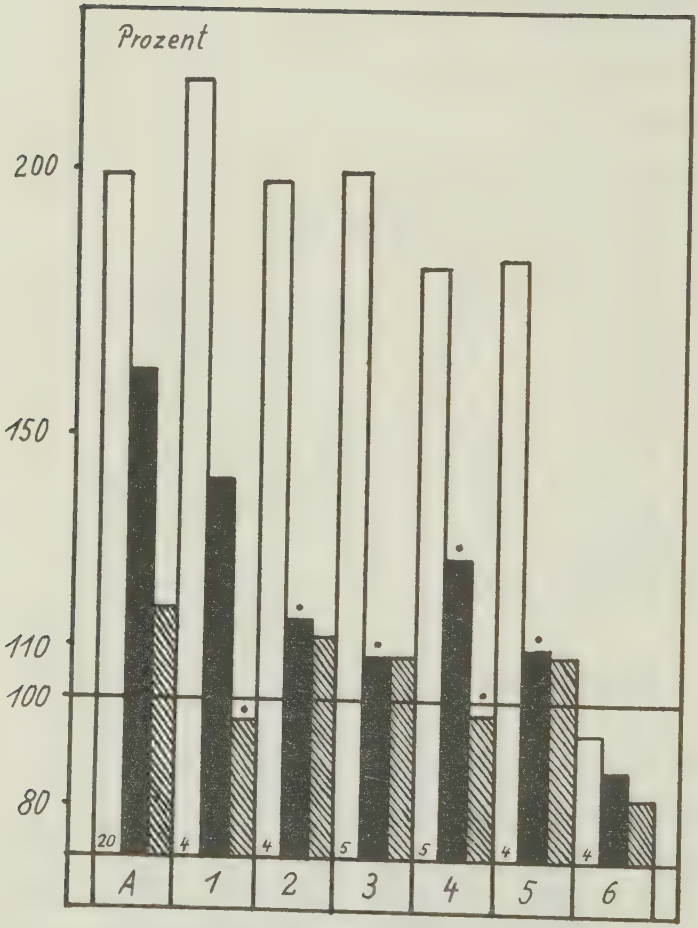


Abb.12: Zur Wirkung von Hydrocortison (H.) auf die Folsäurereaktion der Niere der Maus.

Kennzeichnung der Säulen:

□: Rel. Frischgewicht

■: Proteingehalt

▨: DNS-Gehalt

Kennzeichnung der Säulengruppen:

A:Werte 3 Tage nach i.v.Injektion von
150mg Folsäure/kg K.-Gew.

1: 50mg H./kg K.-Gew. unmittelbar nach Folsäure-Gabe

2: 25mg H./kg K.-Gew. unmittelbar nach Folsäure-Gabe

3: 12,5mg H./kg K.-Gew. unmittelbar nach Folsäure-Gabe

4: 12,5mg H./kg K.-Gew. 6 Std. nach Folsäure-Gabe

5: 6,25mg H./kg K.-Gew. unmittelbar nach Folsäure-Gabe

6: 6,25mg H./kg K.-Gew.

4.2.8. SP_{54}®(Na-pentosanpolysulfuricum)

Angesichts der Hemmung der Folsäure-induzierten Hyperplasie der Niere durch PVS überrascht die gleichartige Wirkung eines anderen SO_4-Reste tragenden Polyanions nicht.Dosen von 6,25 - 50mg erwiesen sich als wirksam, ohne daß sich eine ausgeprägte dosis- oder zeitbedingte Gesetzmäßigkeit andeutete.(Abb.13)

Abb.13:Zur Wirkung von SP_{54}® auf die Folsäurereaktion der Niere der Maus.

Kennzeichnung der Säulen:

□:Rel.Frischgew.

■:Proteingehalt

▨:DNS-Gehalt

Kennzeichnung der Säulengruppen:

A:Werte 3 Tage nach i.v.Injektion von
150mg Folsäure/kg K.-Gew.

1: 50mg SP_{54}/kg K.-Gew. 6 Std.vor Folsäure-Gabe

2: 25mg SP_{54}/kg K.-Gew. 6 Std.vor Folsäure-Gabe

3: 25mg SP_{54}/kg K.-Gew. unmittelbar nach Fols.-Gabe

4: 25mg SP_{54}/kg K.-Gew. 6 Std.nach Folsäure-Gabe

5: 12,5mg SP_{54}/kg K.-Gew. 6 Std.vor Folsäure-Gabe

6: 6,25mg SP_{54}/kg K.-Gew.

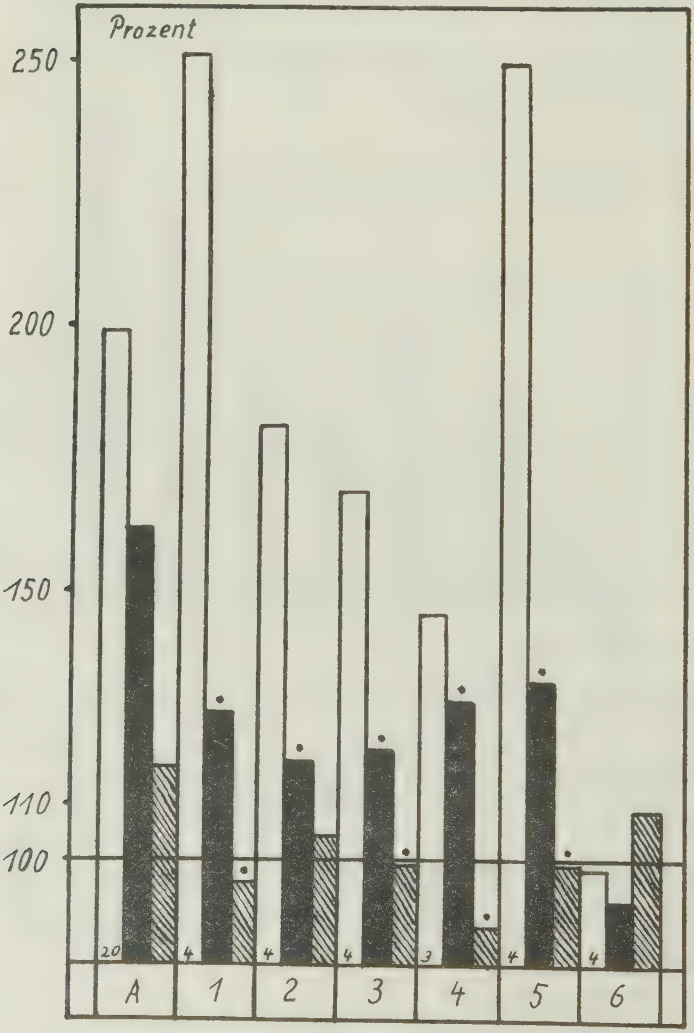


Abb.13

Um zu untersuchen, in welcher Weise sich der Applikationszeitpunkt einer die Reaktion der Niere auf Folsäure hemmenden Noxe auswirkt, wurde im folgenden Teil die jeweils als optimal erkannte Dosis zu verschiedenen Versuchszeitpunkten eingesetzt. Einen Überblick über die Ergebnisse dieser Versuche gibt der folgende Abschnitt.

4.3. Zur Hemmung der Folsäurereaktion (Zeitabhängigkeit)

4.3.1. Relatives Frischgewicht

Die Veränderungen waren hier so unterschiedlich sowohl in Bezug auf die Dosisabhängigkeit als auch hinsichtlich der Zeitabhängigkeit, daß keine spezifischen Aussagen gemacht werden können. (Tab. II)

4.3.2. Proteingehalt

Wie aus Tabelle III zu ersehen ist, hemmten TEM und Hydrocortison den Anstieg des Proteingehaltes vor allem dann, wenn sie gleichzeitig mit Folsäure verabfolgt wurden. (Zeile 3 und 7) Für Actinomycin D, Puromycin, PVS und DNS ist eine gewisse Zeitabhängigkeit darin zu sehen, daß die Proteingehalte annähernd stufenweise abfallen und zwar in der Reihenfolge - 12 - 6 Std. vor, gleichzeitige - 6 - 12 Std. später erfolgende Applikation der oben

genannten Substanzen in Bezug auf die Folsäure-Gabe. (Zeilen 1,2,5 und 6) Bei Ganzkörperbestrahlung und SP_{54} konnte keine signifikante Zeitabhängigkeit festgestellt werden. Zeile 4

4.3.3. DNS-Gehalt

Innerhalb des gewünschten Versuchszeitraumes wirkte sich der Applikationszeitpunkt von Puromycin, Actinomycin D und TEM nur unwesentlich auf die Hemmung des durch Folsäure ausgelösten Anstieges des DNS-Gehaltes aus. GKB unmittelbar oder 6 - 12 Std. nach Folsäure-Gabe war wirksamer als GKB 6 - 12 Std. vor Eintritt der Nierenschädigung. Der analoge Sachverhalt ergab sich auch für SP_{54}. Die PVS-Wirkung war besonders deutlich, sobald die Substanz 6 Std. vor, der Cortisoneffekt, sobald letzteres 6 Std. nach Folsäure-Gabe injiziert wurde. (Tab. IV)

Tabelle II:

Rel. Frischgewicht der Nieren der Maus in Prozent der Kontrollen 72 Stunden nach Injektion von 150mg Folsäure/kg K.-Gewicht unter dem Einfluß von:

Zeile 1: 0,05mg Actinomycin D/kg K.-Gew.

Zeile 2: 0,5mg Puromycin/kg K.-Gew.

Zeile 3: 0,125mg TEM/kg K.-Gew.

Zeile 4: 325 R

Zeile 5: 25mg PVS/kg K.-Gew.

A	+12 std	+6 std	0	-6 std	-12 std
1	186,7 (4)	192,6 (4)	183,5 (4)	178,4 (3)	236,0 (3)
2	168,1 (4)	169,5 (4)	159,5 (4)	206,0 (3)	200,0 (4)
3	186,8 (3)	195,4 (4)	215,0 (4)	232,0 (4)	195,3 (3)
4	172,1 (4)	166,0 (4)	212,0 (6)	201,5 (3)	181,5 (4)
5	155,5 (4)	151,0 (4)	187,5 (4)	246,0 (3)	164,0 (4)
6	179,5 (4)	193,0 (3)	144,1 (6)	205,0 (4)	192,2 (4)
7	186,7 (3)	195,5 (3)	158,2 (6)	182,0 (4)	178,0 (3)
8	177,0 (4)	181,0 (3)	168,5 (4)	146,0 (3)	196,2 (3)

Tab.II

Vergleichswert: Rel. Frischgewicht 72 Std. nach Applikation von 150mg Folsäure pro kg K.-Gewicht= 199,5 ± 13,5% (25)

(n)=Anzahl der Tiere

Zeile 6: 6,25mg DNS/kg K.-Gew.

Zeile 7: 12,5mg Hydrocortison/kg K.-Gew.

Zeile 8: 25mg SP_{54}/kg K.-Gew.

in Abhängigkeit von der Zeit zwischen Applikation der genannten Substanzen und Fols.-Gabe

Zeile A: +: Applikation der Substanz vor Fols.-Gabe
-: Applikation der Substanz nach Fols.-Gabe
0: Applikation der Substanz unmittelbar nach Fols.-Gabe

A	+12 std	+6 std	0	-6 std	-12 std
1	163,0	144,0	118,5 •	128,0 •	108,0 •
2	147,0	131,5 •	113,0 •	109,0 •	89,0 •
3	157,0	135,5 •	105,5 •	128,0 •	131,0 •
4	144,5	150,5	139,0 •	150,0	130,0 •
5	127,0 •	125,0 •	108,2 •	95,0 •	110,0 •
6	140,5 •	161,0	122,5 •	121,0 •	108,0 •
7	131,0 •	140,0	108,0 •	126,5 •	122,5 •
8	117,5 •	118,0 •	120,5 •	129,0 •	124,0 •

Vergleichswert: Proteingehalt 72 Std. nach Applikation von 150mg Folsäure pro kg K.-Gewicht= 162,0 ± 9,5%

Tabelle III: •: $p < 0,05$

Proteingehalt der Nieren der Maus in Prozent der Kontrollen 72 Stunden nach Injektion von 150mg Folsäure/kg K.-Gewicht unter dem Einfluß von:

Zeile 1: 0,05mg Actinomycin D/kg K.-Gew.

Zeile 2: 0,5mg Puromycin/kg K.-Gew.

Zeile 3: 0,125mg TEM/kg K.-Gew.

Zeile 4: 325 R

Zeile 5: 25mg PVS/kg K.-Gew.

Zeile 6: 6,25mg DNS/kg K.-Gew.

Zeile 7: 12,5mg Hydrocortison/kg K.-Gew.

Zeile 8: 25mg SP_{54}/kg K.-Gew.

in Abhängigkeit von der Zeit zwischen Applikation der genannten Substanzen und Fols.-Gabe

Zeile A: +:Applikation der Substanz vor Fols.-Gabe
-:Applikation der Substanz nach Fols.-Gabe
0:Applikation der Substanz unmittelbar nach Fols.-Gabe

A	+12 std	+6 std	0	-6 std	-12 std
1	113,5	110,0	102,1 •	104,5	102,5
2	111,5	110,5	100,5 •	109,0	101,0 •
3	113,0	118,0	108,0	109,0	110,0
4	110,5	106,5	91,0 •	95,0 •	102,0 •
5	106,0	90,5 •	106,5	102,0	109,5
6	113,0	115,0	109,2	111,0	96,5 •
7	105,5	102,0	108,0	97,5 •	104,5
8	108,5	104,0	98,5 •	87,2 •	92,0 •

Vergleichswert:DNS-Gehalt 72 Std.nach Applikation von 150mg Folsäure pro kg K.-Gewicht= 117,0 ± 4,0%

Tabelle IV:

DNS-Gehalt der Nieren der Maus in Prozent der Kontrollen 72 Stunden nach Injektion von 150mg Folsäure/kg K.-Gewicht unter dem Einfluß von:

Zeile 1: 0,05mg Actinomycin D/kg K.-Gew.

Zeile 2: 0,5mg Puromycin/kg K.-Gew.

Zeile 3: 0,125mg TEM/kg K.-Gew.

Zeile 4: 325 R

Zeile 5: 25mg PVS/kg K.-Gew.

Zeile 6: 6,25mg DNS/kg K.-Gew.

Zeile 7: 12,5mg Hydrocortison/kg K.-Gew.

Zeile 8: 25mg SP_{54}/kg K.-Gew.

in Abhängigkeit von der Zeit zwischen Applikation der genannten Substanzen und Fols.-Gabe

Zeile A: +:Applikation der Substanz vor Fols.-Gabe
-:Applikation der Substanz nach Fols.-Gabe
0:Applikation der Substanz unmittelbar nach Fols.-Gabe

4.4. Ergebnisse im Überblick

Verglichen mit Dosiseffekten,war der Einfluß des Applikationszeitpunktes auf die Hemmung der durch Folsäure ausgelösten Nierenreaktion gering.Diesem Tatbestand trägt der Versuch einer zusammenfassenden statistischen Analyse aller vergleichbaren Stichproben Rechnung (Tab.V). Dabei zeigt sich,daß alle vorliegend untersuchten Substanzen inclusive Röntgenbestrahlung die Entwicklung der durch Folsäure ausgelösten Nierenhyperplasie mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $< 1\%$ hemmen.Der Anstieg des Proteingehaltes wurde dabei besonders deutlich durch PVS,die Vermehrung des DNS-Gehaltes besonders ausgeprägt durch Röntgenbestrahlung beeinflußt.

	Rel.Frischgew.		Proteingehalt		DNS-Gehalt		
	$\bar{x}$	Sx	$\bar{x}$	Sx	$\bar{x}$	Sx	n
1	194,1	±19,8	133,8 •••	±20,1	106,8 •••	±4,7	18
2	179,3 •••	±18,7	118,6 •••	±20,8	106,3 •••	±4,8	19
3	218,3 ••	±20,9	131,1 •••	±16,7	111,6 •••	±3,9	18
4	188,3 •	±18,8	142,1 •••	± 7,6	100,3 •••	±7,7	21
5	177,3 ••	±33,3	113,9 •••	±11,5	102,9 •••	±7,0	19
6	178,5	±23,8	128,3 •••	±15,2	108,6 •••	±6,4	21
7	176,7 •••	±14,0	122,8 •••	± 8,4	103,9 •••	±3,9	19
8	173,6 •••	±16,1	121,4 •••	± 4,3	98,5 •••	±7,9	17
9	199,5	±13,5	162,0	± 9,5	117,0	±4,0	25

Tabelle V:

n:Anzahl der Tiere

Rel.Frischgewicht,Protein- und DNS-Gehalt der Nieren der Maus in Prozent der Kontrollen 72 Std. nach Injektion von 150mg Folsäure/kg K.-Gew. unter dem Einfluß von:

Zeile 1: 0,05mg Actinomycin D/kg K.-Gew.

Zeile 2: 0,5mg Puromycin/kg K.-Gew.

Zeile 3: 0,125mg TEM/kg K.-Gew.

Zeile 4: 325 R

Zeile 5: 25mg PVS/kg K.-Gew.

Zeile 6: 6,25mg DNS/kg K.-Gew.

Zeile 7: 12,5mg Hydrocortison/kg K.-Gew.

Zeile 8: 25mg SP_{54}/kg K.-Gew.
12 Std.vor bis 12 Std.nach Folsäure-Gabe

Zeile 9: 150mg Folsäure/kg K.-Gew.

•:$p < 0,05$
••:$p < 0,01$
•••:$p < 0,001$

5. Diskussion

5.1. Zur Reaktion der Niere auf hohe Folsäure-Dosen

Wie bereits im Abschnitt 2.1.4. der vorliegenden Arbeit beschrieben, führt die einmalige Verabreichung von Folsäure in hohen Dosen bei der Ratte zu einer empfindlichen Störung der Nierenfunktion. Die bereits zitierten einschlägigen Untersuchungen haben ergeben, daß es sich bei den auf die Schädigung durch Folsäure folgenden spezifischen Vorgängen um die zelluläre Regeneration des Tubulusepithels auf die Noxe -hohe Folsäuredosis- handelt. Ausdruck der durch Auskristallisation der Folsäure im Tubuluslumen bedingten primären Schädigung des Tubulusepithels ist die sich an die Folsäureapplikation anschließende, etwa 24 Stunden anhaltende Flüssigkeits- und Elektrolytretention. Sie wird erst deutlich bei hohen Folsäuredosen (500mg/kg bei der Ratte und 120 - 150mg/kg bei der Maus) und äußert sich in einer beträchtlichen Erhöhung des Frischgewichtes. Geringere Folsäuredosen haben einen deutlich schwächeren Effekt (12,13,14,v.B.)

Andere Autoren (115) sehen als Folge der Folsäurewirkung neben der Tubulusschädigung durch Auskristallisation eine vorübergehende Ischämie, die durch erhöhten intrakapsulären Druck enstanden ist (Blockade der Tubuli durch Folsäure).

THRELFALL (112) beobachtete bei der Ratte bereits 1 Stunde nach Applikation von 250mg/kg Folsäure einen Anstieg von basischem Zellkernprotein, dem nach 18 Std. ein weiterer Anstieg folgte. Das Maximum war nach 20 Std. erreicht. Parallel lief der RNS-Anstieg. Die DNS-Synthese setzte erst nach 18 Std. verstärkt ein und erreichte nach 32 Std. ihren Höhepunkt. Ebenfalls nach einigen Stunden wurde eine verstärkte Mitoserate verzeichnet, die in den äußeren Abschnitten der Nierenrinde besonders ausgeprägt war.

Die Regression der Veränderungen erfolgt verhältnismäßig langsam und ist auch nach 4 Tagen noch nicht abgeschlossen. Es kommt nun als Folge dieser "unspezifischen Folsäurewirkung"(12) auf das Tubulusepithel des oberen Nephronabschnittes zu umfangreichen Regenerationsvorgängen in diesem Bereich mit Anstieg des RNS-, Protein- und DNS- Gehaltes.

Das Ausmaß der diesem Substanzzuwachs vorangehenden Synthesevorgänge ist offensichtlich dem Umfang der Tubulusschädigung und damit der Folsäuredosis proportional.

Mit steigender Folsäuredosis erhöhen sich Protein- und DNS-Gehalt der Niere weitgehend dosisabhängig (v.B.). Die Maximalveränderungen wurden aber nach kleineren Folsäuredosen später erreicht als unter dem Einfluß hoher Dosen. Als Erklärung bieten sich sekundäre Schädigungsmechanismen an, welche die Synthese von Protein, RNS und DNS einerseits und ihren Verlust (Abbau, Verlust aus ge-

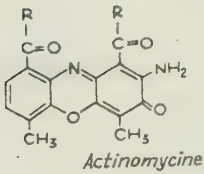
schädigten Zellen) dosisabhängig unterschiedlich erfassen. Da sich die Synthesevorgänge dosisabhängig verhalten und etwa gleichzeitig einsetzen, folgt aus vorliegenden Versuchen, daß bei höheren Schädigungsgraden zunächst Substanzverluste stärker in Erscheinung treten als ihre Neusynthese. Eine ähnliche Erklärung bietet sich auch für die scheinbare Wirkungsumkehr der Folsäure gegenüber dem DNS-Gehalt bei Dosen >120mg/kg an.

5.2. Zur Beeinflussung der durch Folsäure induzierten Reaktion der Niere

5.2.1. Actinomycin D

5.2.1.1. Wirkungsmechanismus

Actinomycine sind Antibiotica mit spezifischer Hemmwirkung auf die DNS-abhängige RNS-Synthese. Eine sehr spezifische Kombination des Hemmstoffes mit der DNS-Matrix hat die Ausschaltung der Polymerasefunktion zur Folge. Die Actinomycine setzen sich aus einem Phenoxazonring und zwei lactonartig gebundenen Pentapeptiden zusammen (Abb.14). Die einzelnen Actinomycine unterscheiden sich nur in der Aminosäure-Sequenz der Polypeptid-Seitenketten voneinander. Am Hemmstoffmolekül müssen nach REICH und GOLDBERG (88) folgende Funktionen vorhanden sein, damit es biologische Funktion besitzt:



Actinomycine

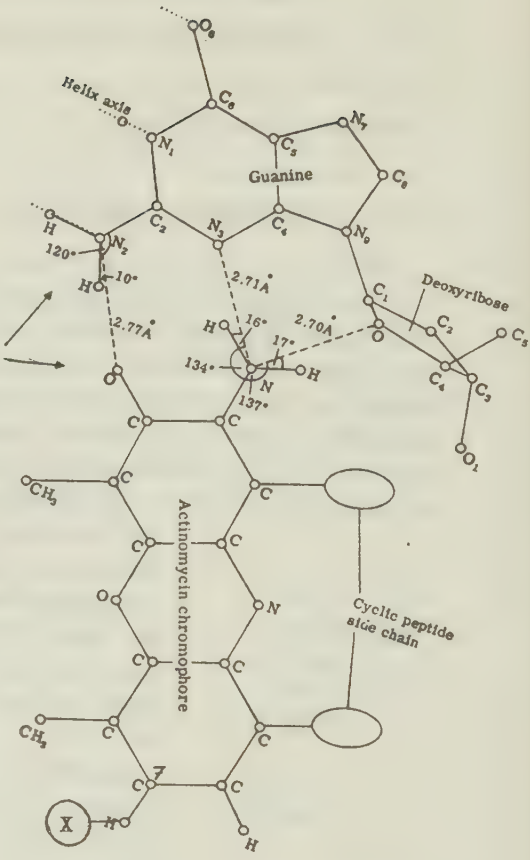
Abb.14

1. eine freie NH_2-Gruppe am Phenoxazonring.
2. der chinoide Sauerstoff des Chromophors.
3. die Peptid-Lactonringe.

Die unter 1 und 2 genannten Gruppierungen werden zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu den DNS-Nucleotiden gebraucht. Den Peptiden kommt wahrscheinlich eine sterische Funktion bei der Bindung zu, weil auch von seiten der DNS bestimmte strukturelle Voraussetzungen für eine Komplexbildung gegeben sein müssen:

1. die native Doppelhelix-Struktur.
2. die NH_2-Gruppe in 2-Stellung eines Desoxyguanosins.
3. eine bestimmte Orientierung der Bindungsorte in der Helixstruktur.

Abb.15:



Bindung des Actinomycins an den Guanosin-Rest eines Basenpaares durch Wasserstoffbrücken in der DNS-Doppelspirale nach den Vorstellungen von GOLDBERG und REICH. Die Aminogruppe des Actinomycins heftet sich an den Guanosin-Rest der DNS an. Wird in der Position 7 des Actinomycins die große Stearylamino-Gruppe (X der Abb.) angelagert, so ist die Bindungsfähigkeit nicht eingeschränkt. Dies spricht dafür, daß dieser Teil des Actinomycin-Moleküls an der Bindung nicht beteiligt ist.

Die NH_2-Gruppe des Chromophors wird durch je eine Wasserstoffbrücke am N_3 des Guanins und am Sauerstoff der Desoxyribose verankert, während die NH_2-Gruppe des Purinkerns in 2-Stellung eine dritte H-Bindung zum Chinonsauerstoff des Actinomycins ausbildet. Da aber nur Guanin durch eine 2-Aminogruppe ausgezeichnet ist, ist die Basenspezifität des Hemmstoffes charakterisiert. Bestätigt wird diese Tatsache durch die Möglichkeit einer Bindung des Actinomycins an das synthetische Polynucleotid "Poly-(A-T)", wenn bei diesem Adenin durch

2-Aminopurin oder 2,6-Diaminopurin ersetzt wird, also künstlich eine NH_2-Funktion in 2-Stellung erzeugt wird (21).

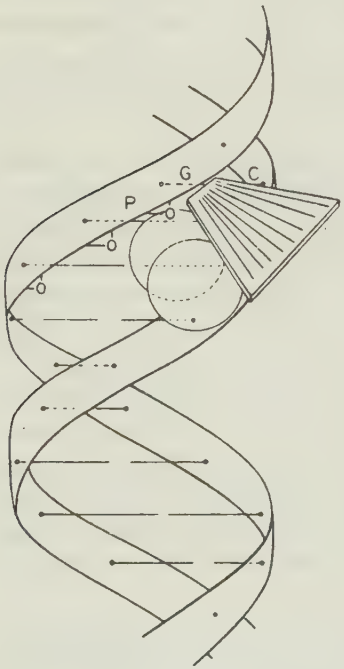


Abb.16:

Schematische Darstellung der sterischen Verhältnisse bei der Bindung von Actinomycin an die DNS-Doppelhelix nach der Vorstellung von GOLDBERG und REICH. Das trapezförmige Gebilde symbolisiert den Phenoxazonkern, die Kreise stehen für die Peptidlactone des Hemmstoffmoleküls.

Die beiden Pentapeptide ordnen sich so an, daß sie in der schmalen Helixfurche der DNS zu liegen kommen (79,81,85,125). Außerdem können hydrophobe Wechselwirkungen zwischen bestimmten Alkylgruppen der Peptidlactone und Desoxyribose-Resten stattfinden, welche eine festere Komplexstruktur zur Folge haben (80). Da in der schmalen Helixfurche die RNS-Polymerase lokalisiert ist, wird verständlich, daß das Actinomycin außer der Blockierung der Matrizenfunktion im Hemmstoff-DNS-Komplex auch eine Verdrängung des Enzyms vom Wirkungsort nach sich ziehen dürfte. Da sich die DNS-Polymerase aber in der breiten Helixfurche befinden soll, wird die DNS-Reduplikation somit primär nicht beeinflußt. Die Bindung der Actinomycin-Moleküle an die DNS ist von unterschiedlicher Stärke (20). Eine lockere Bindung nur über

Wasserstoffbrücken ist relativ unspezifisch. Voraussetzung für die biologische Wirksamkeit des Actinomycins ist eine feste Bindungsart unter Einbeziehung sterischer Gegebenheiten und unter Covalenzbeteiligung. An der lockeren Bindung eines Actinomycin-Moleküls sind 7 Basenpaare beteiligt; bei der festen Bindung kommt nur 1 Molekül Hemmstoff auf 200 Nucleotide (20,36).

Die Actinomycine können die Mitochondrien-Membranen nicht durchdringen mit Ausnahme der Mitochondrien einiger Tumorzellen. So ist z.B. die Polymerasereaktion in den Mitochondrien der Leberzellen gegenüber Actinomycin unempfindlich, im Gegensatz zu der entsprechenden Reaktion im Zellkern (81). Actinomycin hemmt die Proteinsynthese indirekt, da eine Hemmung der RNS-Synthese zwangsläufig nach einiger Zeit zur Beeinträchtigung der Proteinsynthese führen muß (18,78,87,118, v.B.).

Es ergibt sich folgender Kreislauf: Für die Synthese eines spezifischen Proteins (Polymerase) ist DNS als Matrize notwendig. Die Synthese neuer RNS oder DNS kann jedoch nur nach Neubildung eines solchen spezifischen Proteins erfolgen.

Es wurde auch eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Zelle gegenüber Actinomycin in den einzelnen Phasen der Zellteilung festgestellt. So sind die Zellen dann besonders resistent, wenn sie in die S-Phase gelangen. In der späten S-Phase wächst die Empfindlichkeit wieder. In der G_1-Phase sind die Zellen 30-fach empfindlicher als in der G_2-Mitose-Phase (29,97).

5.2.1.2. Vorliegende Befunde

Wurde Actinomycin in Dosen von 0,0125 - 0,05mg/kg unmittelbar nach Folsäure-Gabe injiziert, lag der Protein-Gehalt der so behandelten Mäuse am 3.Versuchstag 35-55% unter jenem der reinen Folsäure-Kontrolltiere. Unter den gleichen Bedingungen blieb der DNS-Gehalt der Nieren maximal 30% unter dem Vergleichsmittel. Die Wirkung von Actinomycin verminderte sich dagegen, sobald die Substanz einige Stunden nach Folsäure-Gabe injiziert wurde.

Während sich diese Befunde unschwer dem skizzierten Wirkungsmechanismus von Actinomycin zuordnen lassen, erscheint der Wirkungsabfall der Substanz bei höheren Dosen (0,1 und 0,2mg/kg) paradox. Immerhin bleiben folgende Erklärungsmöglichkeiten zu berücksichtigen:

1. Die Annahme, daß durch Actinomycin D die Proteinsynthese schlechthin gehemmt würde, stellt eine mittlerweile nicht mehr uneingeschränkt haltbare Vereinfachung dar, wie sich aus dem Aktivitätsanstieg einiger Enzyme von Ratte und Maus im Verlauf einer Actinomycin-Behandlung ergibt (26). Auf die Möglichkeit einer "Superinduktion" durch das Antibioticum verweisen schließlich die Untersuchungen von THOMPSON et al.(110) am Beispiel der Tyrosinaminotransferase von Rattenhepatomzellen.

2. Da vorliegend lediglich der Gehalt der Nieren an Protein und DNS gemessen wurde, kann sich eine Synthesehemmung dann ihrem Nachweis entziehen, wenn der durch

Abfall der Syntheserate bedingte Substanzverlust sekundär durch erhöhte Retention oder verstärkten Zufluß aus extrarenalen Geweben ausgeglichen, anders ausgedrückt durch sekundäre Schädigungsmechanismen überlagert wird. Letztere werden umso wahrscheinlicher, je höher Actinomycin dosiert wird. Demgegenüber wurden aber DNS-und Proteingehalt der Nieren von Mäusen durch alleinige Gabe von Actinomycin D in entsprechend hohen Dosen nicht vergrößert, sondern deutlich vermindert, so daß die unter 2. angedeutete Erklärungsmöglichkeit zunächst ausscheidet. Mit den vorliegenden Befunden vergleichbar sind die Ergebnisse von THRELFALL et al.(113): Diese Autoren verabreichten Ratten 0,25mg/kg Actinomycin D unmittelbar und 4 Std. nach Gabe von 250mg/kg Folsäure und hoben damit die Folsäurewirkung auf die Protein- und Nucleinsäuresynthese der Niere praktisch auf. Wurde die gleiche Menge Actinomycin 8, 15, 18, 20 und 23 Stunden nach Folsäure appliziert, so ergab sich ein etwa linearer Wirkungsrückgang.

5.2.2. Puromycin

5.2.2.1. Wirkungsmechanismus

Das Antibioticum Puromycin ist ein Hemmstoff der Protein-Biosynthese.(45,81).Puromycin blockiert die Proteinsynthese als "substratähnlicher Antimetabolit" einer aktivierten Aminosäure (6,44,70).

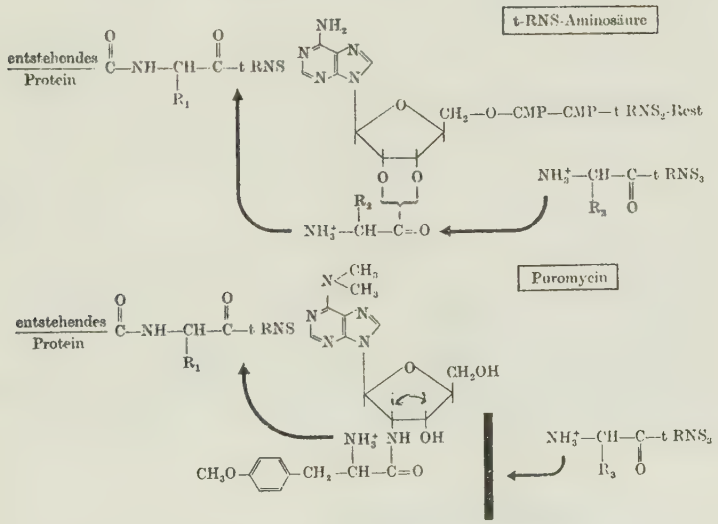


Abb.17: Wirkungsmechanismus von Puromycin

Wie aus Abb.17 hervorgeht,wird die Aminogruppe des Aminosäurerestes vom Puromycin an das Carboxyl-Ende der wachsenden Polypeptidkette angeknüpft.Daraus resultiert eine echte Peptidbindung zwischen dem bereits gebildeten Proteinrest und dem Puromycin.Der Angriffspunkt des Puromycins liegt somit an der Stelle des Ribosoms,an der die Peptidbindung geknüpft wird.Das polymerisierende Ferment ist offenbar so unspezifisch,daß das Puromy-

cin an die Stelle einer Aminosäure-t-RNS treten kann. Ein weiteres Wachstum einer solchen unfertigen Polypeptidkette mit angeheftetem Puromycin-Rest ist nicht mehr möglich, da eine Peptidbindung zwischen dem Aminosäure-Rest des Puromycins und der nächst-folgenden Aminosäure-t-RNS nicht mehr erfolgen kann. Unter der Wirkung von Puromycin entstehen also unfertige Proteine, die an ihrem Carboxyl-Ende den Puromycin-Rest tragen und die vorzeitig vom Ribosom abgelöst werden. Diese Protein- oder Enzymfragmente sind natürlich auch nicht funktionsfähig.
Nach den Beobachtungen von EPIFANOVA et al.(30) hemmt die dauernde Einwirkung von Actinomycin bzw. Puromycin den Eintritt synchronisierter Gewebskulturzellen in die S-Periode. Befanden sich die Zellen in der "frühen S-Phase", wurde die DNS-Synthese in Gegenwart der beiden Antibiotica nicht zu Ende geführt. In der späten S-Phase waren die Zellen nur gegenüber Actinomycin D empfindlich. Umgekehrt wurde der Eintritt und die Aufrechterhaltung der Mitose in Gegenwart von Puromycin vollständig blockiert, während Actinomycin D beide Prozesse lediglich verzögerte. Diese Befunde bestätigen damit erneut die Abhängigkeit der DNS-von der Proteinsynthese und zeigen, daß Puromycin beide Syntheseschritte hemmen kann.

5.2.2.2. Vorliegende Befunde

Dem geschilderten Wirkungsmechanismus von Puromycin entsprechend ist die gegenüber dem Proteingehalt der durch Folsäure geschädigten Nieren besonders deutliche Wirkung der Substanz nicht überraschend. Den stärksten Hemmeffekt hatte Puromycin in Dosen von 0,5mg/kg unter der Voraussetzung der Gleichzeitigkeit von Folsäure-

und Puromycin-Gabe.Da das Stadium aktivster Proteinsynthese erst nach Ablauf von 20 Stunden nach Folsäuregabe durchlaufen wird,ist der Wirkungsabfall bei Applikation 6 Stunden nach Versuchsbeginn im Hinblick auf den Wirkungsmechanismus des Antibioticums zunächst überraschend und auf grund der vorliegenden Versuche nicht erklärbar.Entsprechendes gilt auch im Hinblick auf die scheinbare Wirkungsumkehr nach "höheren" Puromycin-Dosen.

5.2.3. Ionisierende Strahlen

5.2.3.1. Wirkungsmechanismus

Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Wellen, die sich mit Lichtgeschwindigkeit geradlinig fortpflanzen und sich wie das sichtbare Licht verhalten. Sie zeigen Zerstreuung, Brechung, Beugung, Interferenz, Reflexion und Polarisationsfähigkeit. Ihre biologische Wirksamkeit beruht auf der ionisierenden Wirkung der Strahlen innerhalb der Gewebszellen. Letztere können je nach Stärke und Dauer der Bestrahlung und Eigenart des Gewebes hinsichtlich all ihrer Funktionen vorübergehend oder dauernd geschädigt werden. Diese Vorgänge werden heute vorwiegend auf die nach Behandlung mit ionisierenden Strahlen auch in vivo faßbaren Veränderungen an der DNS der Zellkerne zurückgeführt: Neben Kettenbrüchen lassen sich auch chemische Veränderungen und Zerstörung der Basen nachweisen (93). Daraus resultiert eine Schädigung der Matrizenfunktion der DNS mit Hemmung von DNS-Reduplikation und Zellteilung. Die Matrizenfunktion der DNS innerhalb der Proteinsynthese gilt im allgemeinen als weniger strahlenempfindlich (86,98). Die einzelnen Phasen der Zellteilung sind gegenüber der Bestrahlung unterschiedlich empfindlich, wie Untersuchungen an der nach Teilhepatektomie regenerierenden Leber zeigen. So verzögern verhältnismäßig kleine Strahlendosen (25-450R) den Beginn der DNS-Synthese, wenn sie in der G_1-Phase (vor dem Einsetzen erhöhter DNS-Synthese) wirksam werden. Wird in der sich an die G_1-Phase anschließenden S-Phase (Phase der DNS-Synthese) bestrahlt, so sind wesentlich höhere Strahlendosen (1000-2000R) notwendig, um eine meßbare DNS-Synthesehemmung zu erzielen (37,66,67). Als Angriffspunkte ionisierender Strahlen kommen verschiedene nukleäre und zytoplasmatische Faktoren in Frage. Hervor-

zuheben sind unter anderen Hemmungen im Bereich der Nucleotidphosphorylierung und Veränderungen an der zelleigenen Starter-DNS.(5,107).Von besonderer Bedeutung ist auch die strahleninduzierte Hemmung der Induktion einiger für die DNS-Synthese erforderlicher Enzyme. Da ihre Synthese vor allem in der G_1-Phase erfolgt, wird die besondere Strahlenempfindlichkeit dieses Stadiums der Zellen verständlich.
Als biologische Versuchsobjekte für Strahlenschäden eignen sich Gewebe mit intensiver Zellteilung besonders gut.Dazu gehören u.a. wachsende Organe von Jungtieren oder Gewebe während der Regeneration.HEIM et al.(48) beispielsweise stellten nach einmaliger Leberbestrahlung neugeborener Mäuse innerhalb der ersten 4 Tage einen starken Rückgang des DNS- und RNS-Gehaltes fest.Ebenso nahm die Zellzahl ab,während Organgewicht und Proteingehalt kaum beeinflußt wurden.In den folgenden Tagen näherten sich die einzelnen Werte denen der Kontrollen. Zu erneutem Abfall kam es am 8. bzw. 15. Tag.Jetzt beteiligten sich an der Verminderung auch der Proteingehalt und das Organgewicht.Da eine der wesentlichsten primären Wirkungen von ionisierenden Strahlen in der Störung der Matrizenfunktion der DNS besteht,wird verständlich,daß die Synthese der DNS und RNS zuerst und am stärksten beeinflußt wird,während die im Protoplasma ablaufende Proteinsynthese wahrscheinlich mit der noch vorhandenen RNS oder den bereits vor der Bestrahlung gebildeten Enzymen weiterläuft und erst sekundär reagiert.Die zwischenzeitliche "Erholungsphase" wird so gedeutet,daß die strahleninduzierte Mitosehemmung zeitlich befristet ist.Nach einer gewissen,von der Strahlendosis abhängigen Zeitspanne,beginnt dann ein Teil der Zellen mehr oder weniger synchron in die Mitose einzutreten.Je nach Größe der Schädigung hat jedoch ein Teil der Zellen die Fähigkeit der unbegrenzten Vermehrung verloren.Sie sterben nach einigen mehr oder minder

vollständigen Teilungsvorgängen schließlich doch ab. Dies bedingt wahrscheinlich den zweiten Abfall der Zellbestandteile.

5.2.3.2. Vorliegende Befunde

Die vorliegenden Befunde decken sich im wesentlichen mit den bisherigen Untersuchungen. Mit gewissen Einschränkungen ist die DNS-Synthesehemmung der Größe der Strahlendosis proportional. Bereits verhältnismäßig kleine Strahlendosen (325R), 0 bis 12 Stunden nach Folsäure-Gabe (also in der G_1-Phase) verabfolgt, heben den durch Folsäure induzierten Anstieg des DNS-Gehaltes der Niere der Maus praktisch auf. Der Einfluß der Röntgenbestrahlung auf Proteingehalt und relatives Frischgewicht der Nieren war (wie zu erwarten) in dem hier verwendeten Versuchszeitraum ohne Bedeutung.
Im Unterschied zu den Versuchen mit Actinomycin D oder Puromycin ist die besondere Empfindlichkeit der DNS-Synthese gegenüber ionisierenden Strahlen auch aus den vorgelegten Untersuchungen ablesbar.

5.2.4. Biologische Alkylantien (nebst TEM)

5.2.4.1. Wirkungsmechanismus

Alkylantien sind Verbindungen, die die Fähigkeit besitzen, ein Wasserstoffatom in einem anderen Molekül durch ein Alkylradikal (C_nH_{2n+1}) zu ersetzen. Sie gehören somit der Klasse der Radiomimetica an, die durch Einwirkung auf den Ruhekern mutagen und carcinogen wirken, die Mitose hemmen und echte Chromosomenbrüche erzeugen (4:p.195). Da hinsichtlich der Endwirkungen am biologischen Objekt eine große Ähnlichkeit zwischen radiomimetisch wirkenden chemischen Substanzen und ionisierenden Strahlen besteht, ist der 1947 von DUSTIN (31) geprägte Begriff zutreffend.

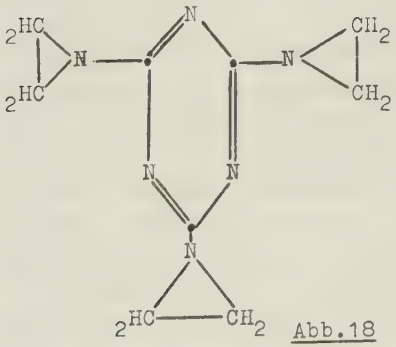


Abb.18

Zu den alkylierenden Verbindungen gehören neben Schwefel- und Stickstofflostderivaten, Äthylenimin-en, Epoxyden und Methansulfonsäureestern (3,31) auch Nitrosoharnstoffderivate, die neuerdings zur Erzeugung von Experimentaltumoren herangezogen werden (75). Das Wesen der Alkylierungsreaktion besteht in dem elektronenarmen (elektrophilen) Angriff des Alkylans an einem elektronenreichen (nucleophilen) Zentrum. Substanzen mit zwei oder mehreren alkylierenden Gruppen (bi- oder polyfunktionell) sind dabei bedeutend wirksamer als solche mit einer Gruppe (4:p.199).

Wie Abb.18 zeigt, besitzt TEM (2,4,6-Triäthylenimino-1,3,5-triazin) drei solcher Wirkungsgruppen. Die alkylie-

rende Wirkung des Äthylenimins beruht auf einer sehr leicht erfolgenden Öffnung des "energetisch-gespannten" Äthyleniminringes im wässrigen Milieu. Dabei können z.B. biologische Bausteine oder Enzyme mit leicht beweglichen Wasserstoffatomen alkyliert und damit denaturiert werden (3). Der alkylierende Effekt bei Lostverbindungen beruht auf der hohen Reaktivität der Chloratome in β-Stellung zum Loststickstoff (3).
Von den meisten Autoren wird heute übereinstimmend der Reaktion der alkylierenden Substanzen mit der DNS eine vorrangige Bedeutung zuerkannt (2,8,39,73,91,94).
Die stärkste Alkylierung findet am Stickstoff in Position 7 des Guanin statt (72). Die Alkylierung am Guanin in dieser Position verursacht eine Lockerung der glykosidischen Bindung zwischen der Purinbase und der Desoxyribose. Die Sprengung dieser Bindung führt zur Freisetzung von alkyliertem Guanin und zur Depurinisation der DNS (91). Damit besteht die Möglichkeit einer im Anschluß daran auftretenden Lockerung der Desoxyribose-Phosphat-Bindung und einer Kettenruptur der DNS (1). Wenn jedoch diese einfach alkylierte DNS intakt bleibt, kann sie als Matrize zur DNS-Replikation benutzt werden. Die Folge hiervon wäre eine fehlerhafte Basenpaarung am Ort des alkylierten Guanin, woraus eine Alteration des genetischen Code resultiert. Andererseits können auch Vernetzungen an der DNS durch bi- und polyfunktionell alkylierende Mittel zur Beeinträchtigung oder Aufhebung der Funktion führen (69,92).
Nach NEUBERT (81) werden radioaktiv markierte alkylierende Substanzen an die Mitochondrien-DNS in wesentlich stärkerem Maße gebunden als an die Zellkern-DNS. Auch die resultierende Hemmung der RNS-Polymerase ist an Mitochondrien aus Tumorzellen häufig wesentlich stärker ausgeprägt als in den entsprechenden Zellkernen. Dieser Befund weist auf die Möglichkeit hin, daß die Effekte von biologischen Alkylantien gegenüber dem Zellkern bislang möglicherweise überbewertet wurden.

5.2.4.2. Vorliegende Befunde

Die bevorzugte Wirkung alkylierender Substanzen auf den Nucleinsäurestoffwechsel wurde am Beispiel von TEM in den vorliegenden Versuchen bestätigt.Die verwendete TEM-Dosis (0,06 - 1,0mg/kg) verminderte in fast jeder Versuchsreihe den DNS-Gehalt der durch Folsäure induzierten Niere der Maus signifikant (maximal um 30%, wenn TEM 6 Stunden vor Folsäure appliziert wurde).Der Applikationszeitpunkt war innerhalb des gewählten Versuchszeitraumes (24 Std.) von untergeordneter Bedeutung. Gering war auch der Einfluß auf das relative Frischgewicht und den Proteingehalt.Wurde TEM allein verabreicht, war gleichfalls ein DNS-Abfall gegenüber den Kontrollen zu verzeichnen.Letzterer blieb aber hinter den Werten der mit Folsäure vorbehandelten Tiere zurück.Da entsprechend dem Wirkungsmechanismus der Radiomimetica besonders Gewebe mit einer normalerweise schnellen Zellteilungsrate betroffen werden (Tumorzellen,embryonale Gewebe,blutbildende Organe,Zellen der Darmschleimhat u.a.), überrascht die deutliche Wirkung solcher Substanzen auf Regenerationsvorgänge nicht.Dies gilt auch für die Regeneration der Niere nach Schädigung durch Folsäure (81,v.B.).

Die Blockierung der Primerfunktion von nativer DNS für die Messenger RNS-Synthese und die Blockierung des Ribonucleotid-Reduktase-Systems sehen KUMMER und OCHS (65) als Ursache der Hemmwirkung alkylierender Cytostatica an.

Bei (^{14}C) Thymidin-Markierung von Asciteszellen kam es dadurch zu einer (^{14}C) Thymidineinbau-Hemmung, daß die "de novo"-Synthese der basenanalogen Desoxynucleotide blockiert wurde.

Den Wirkungsmechanismus von TEM untersuchten COMORO-SAN et al.(24) an Tumorzellkulturen (Epidermoidkarzinom) mit Hilfe markierter Substanzen. Nach Inkubation mit TEM wurden dabei der Einbau von ^{14}C-Arginin in Kernproteine und der Einbau von ^{14}C-Leucin in cytoplasmatische Proteine gehemmt (stündliche Inkubation von 1,6µM TEM). Ferner ergab sich eine Dissoziation der DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese. Die aus TEM-behandelten Kulturen extrahierten Desoxyribonucleoprotein-Komplexe zeigten ein verändertes Protein/DNS-Verhältnis sowie veränderte Löslichkeitscharakteristiken in Lösungen verschiedener Ionenstärke.

5.2.5. Polyanionen

5.2.5.1. Wirkungsmechanismus

Polyanionen sind Verbindungen mit den Eigenschaften anionischer Polymere wie Heparin, Dextransulfat oder Polyäthylensulfat. Sie können in vitro Prozesse beeinflussen, an denen Nucleinsäuren beteiligt sind.
Nach heute geltender Ansicht lassen sich fast alle enzymatischen Reaktionen, an denen Nucleinsäuren beteiligt sind, durch Polyanionen beeinflussen (120). Dies gilt sowohl für DNasen und RNasen als auch für DNS-Polymerase, RNS-Polymerase und die zellfreie Proteinsynthese (22, 25,40,61,120,123). Auch Nucleinsäure-Methylasen können durch Polyanionen gehemmt werden (11).
Polyanionen wirken im allgemeinen unspezifisch, weil ihrer Wirkung in Nucleinsäure-abhängigen Enzymsystemen elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Substrat zugrundeliegen. Mit anderen Worten: Kompetitive elektrostatische Wechselkräfte bestimmen vorzugsweise, ob das kationische Enzym mit dem poly-anionischen Inhibitor oder ob es mit seinem poly-anionischen Substrat reagiert (9, 101). Dem Prinzip nach ähnlich, wenn auch infolge Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Basen spezifischer (24) wirken unter bestimmten Voraussetzungen Polynucleotide und Nucleinsäuren mit ihrer Zusammensetzung, Konfiguration oder Konformation nach gegenüber dem jeweiligen Nucleinsäure-System veränderter oder herabgesetzter Nativität (24,32,35,46,47,51,114).

Von Bedeutung für die Wirksamkeit anionischer Makromoleküle sind Art, Verteilung und Dichte der den polyanionischen Charakter gewährleistenden Gruppen. Bei gleicher Molekülgröße sind Verbindungen mit geringerer Ladungsdichte oder schwächer dissoziierenden anionischen Gruppen weniger wirksam (22,23).

In den nucleisäure-abhängigen Enzymsystemen sind polyanionische Sulfate bzw. Sulfonate besonders wirksam (24,123,126).Da elektrostatische Wechselwirkungen wesentlichen Anteil an der hemmenden Wirkung polyanionischer Verbindungen haben,wird die hemmende Aktivität durch alle Faktoren vermindert,welche die Dichte der negativen Ladungen bzw.ihre Dissoziierbarkeit herabsetzen.Dazu gehören die Erhöhung von Ionenkonzentration und pH-Wert sowie der Zusatz kationischer Verbindungen wie z.B. Protamin oder Spermin (77,101).
Nach WACKER et al.(120) läßt sich die zellfreie Proteinbiosynthese spezifisch und unspezifisch hemmen. Spezifisch in der Weise,daß die verwendete m-RNS nach dem Prinzip der Basenpaarung mit einem zweiten Polynucleotid eine Doppelhelix bildet und somit die Codeeigenschaften für das Anticodon in der t-RNS verlorengehen.Die unspezifische Hemmung wird so gedeutet,daß Polyanionen von der Struktur des Dextransulfats,Polyäthylensulfonats und Heparins mit der polyanionischen m-RNS um die für die Proteinbiosynthese notwendigen Enzyme konkurrieren.Die Ergebnisse mit den Polykationen Polylysin und Protamin stützen diese Annahme;denn mit beiden Verbindungen ließ sich einmal die Heparinhemmung aufheben;zum anderen wirkten diese Polykationen alleine gegeben,ebenfalls hemmend.
Die neuerdings beobachtete Hemmung der Antikörperbildung durch Polyäthylensulfonat (71,121) sowie die Wirkung nicht-nucleotidartiger (46,47,100,117) und nucleotidartiger (35,114) Polyanionen auf das Wachstum von Experimentaltumoren lassen eine gewisse Übertragbarkeit der vorläufig vor allem an In vitro-Systemen eingehend untersuchten Polyanionen-Wirkungen auf komplexere (in vivo)-Systeme erwarten.
In die gleiche Richtung weisen auch die vorliegenden Ergebnisse.

5.2.5.2. Vorliegende Befunde

25 - 75mg/kg PVS bzw. 6,25 - 50mg/kg SP_{54} verminderten den Proteingehalt der Niere der Maus nach Schädigung durch Folsäure signifikant.Eine deutliche Dosis- oder Zeitabhängigkeit wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht beobachtet.Unter den gleichen Versuchsbedingungen war der Abfall des DNS-Gehaltes weniger ausgeprägt (maximal etwa 30% bei SP_{54} und 20% bei PVS). Prinzipiell ähnlich wirkten DNS-Gaben in Dosen von 6,25 - 25mg/kg.Der letztere Befund ist insofern überraschend,als In vivo-Versuche an der Maus deutliche Wirkungsunterschiede zwischen polyanionischen Sulfaten und hochmolekularen DNS-Präparaten zeigten(108).Wiederholte Applikation von PVS (25mg/kg) bzw. SP_{54} (62,5mg/kg) führte zu einem 10 - 20%igen Proteinverlust bei Leber und Niere,während Organgewicht und DNS-Gehalt in dieser Zeit leicht zunahmen.Dem langanhaltenden etwa 30 - 40%igen Aktivitätsabfall der DNase I in diesen beiden Organen nach Gabe von PVS oder SP_{54} ist der deutliche und spezifische Aktivitätsanstieg des Enzyms in Lunge,Leber, Milz und Nieren im Verlauf der Behandlung mit DNS (50 - 100mg/kg) gegenüberzustellen.Bereits DNS-Dosen von 12,5mg/kg erhöhten die DNase I-Gesamtaktivität um rd. 40%.Auch der Proteingehalt und DNS-Gehalt in Lunge,Leber,Milz und Nieren war signifikant erhöht.
Weiter verkompliziert werden die Verhältnisse durch die gelegentliche Beobachtung stimulierender Einflüsse

von Heparin (109) oder DNS (35) auf Nucleinsäure-abhängige Reaktionen in vitro oder an Gewebskulturen. Schon kleine PVS-Dosen steigerten in vitro auch den Abbau von DNS und DNase I (109,126).Über Art und Umfang der Wechselwirkung zwischen zelleigenen und zellfremden Polyanionen entscheidet also offenbar Konzentration,Verteilung und Art des Reaktionspartners,wobei es in komplexen Systemen möglicherweise gleichzeitig zu hemmenden und fördernden Einflüssen kommen kann (7,61,62,63,64,103,121).

Die vorliegenden Befunde sprechen allerdings dafür,daß die eingesetzten Polyanionen in der gewählten Dosierung die Proteinsynthese der Niere nach Gabe hoher Folsäuredosen hemmen.

5.2.6. Nebennierenrindenhormone

5.2.6.1. Wirkungsmechanismus

Alle Hormone der Nebennierenrinde sind Steroide und haben 21 C-Atome. Neben der stets vorhandenen ungesättigten Ketogruppe in 3-Stellung tragen sie in der Seitenkette eine Keton-und eine Alkoholfunktion. Als eigentliche Nebennierenrindenhormone sind Cortisol, Corticosteron und Aldosteron anzusehen (58, 33). Cortison trägt in Position 11 statt einer OH-Gruppe nur einen Sauerstoff und stimmt in den meisten Wirkungen mit denen des Cortisols überein (33). Wird in das Cortisol eine zusätzliche Doppelbindung eingeführt, so nimmt die antiphlogistische Wirkung um den Faktor 4-5 zu (Prednison, Prednisolon). Wird in Position 9 ein Wasserstoff durch Fluor ersetzt, so erhält man das Dexamethason und die antiphlogistische Wirkung steigt um den Faktor 25 an.

Bereits in physiologischen Dosen können Steroidhormone teilweise die Wasserstoffbrücken sprengen, die in der DNS beide Nucleinsäuren miteinander verbinden (33).

Da die Ablesung der genetischen Information wahrscheinlich nur an den Stellen des DNS-Fadens erfolgt, bei denen die Verknüpfung mit dem korrespondierenden Faden der Doppelhelix gelöst ist, haben verschiedene Hormone die Funktion, den DNS-Doppelstrang an bestimmten Stellen zur Weitergabe der genetischen Information freizulegen. Als morphologischer Ausdruck dieses Vorganges gilt das sog. "Puffing Phänomen", das bei Speicheldrüsen-Chromosomen von Insekten nachgewiesen worden ist (33). Man nimmt an, daß nur an diesen puffärmelähnlichen Chromosomenauftreibungen die Produktion der Messenger-RNS erfolgt. Die Hormonspezifität liegt weniger im Hormon selbst, als im Erfolgsorgan.

Im Zusammenhang mit der Induktion von Enzymen durch Steroidhormone wird ein weiterer molekularbiologischer Wir-

kungsmechanismus diskutiert, nämlich die Verbindung des Hormons mit einem Repressormolekül (Protein). Dadurch wird die bisher blockierte DNS freigelegt, die Synthese von Messenger-DNS kommt in Gang, und an den Ribosomen wird schließlich das Enzymprotein gebildet (58,33). Durch Gabe von Hydrocortison wird sowohl die ribosomale RNS- als auch die m-RNS-Synthese stimuliert. Die Stimulierung der zytoplasmatischen r-RNS folgt mit einiger Verzögerung. Wahrscheinlich besteht die primäre Wirkung der Glucocorticoide in einer Beeinflussung der Synthese von spezifischer m-RNS-Fraktionen (33).

5.2.6.2. Vorliegende Befunde

Werden Glucocorticoide in hohen Dosen verabreicht, so kommt es besonders in lymphatischen Organen zu einem sehr ausgeprägten Proteinabbau (33).
Unter vergleichbaren Bedingungen und an geeigneten Versuchsobjekten zeigen Nebennierenrindenhormone auch Hemmeffekte gegenüber der Protein- und DNS-Synthese.
So untersuchten RICHTER et al. (90) in vitro Biopsieproben der menschlichen Leber nach wiederholtem Zusatz von Prednisolon in Dosen von 25 - 50mg/Tag. Zu einer signifikanten Erniedrigung der Proteinsynthese kam es erst nach wiederholter Prednisolongabe. An der regenerierenden Rattenleber zeigte sich am 2. Tag eine Hemmung des Einbaues von 3H-Thymidin in die DNS nach Applikation von 3mal 20mg Cortison/Tag (41).
In den vorliegenden Untersuchungen erniedrigte die einmalige Gabe von Prednisolon in Dosen von 6,25 - 25mg/kg

den Protein- und DNS-Gehalt der durch Folsäure induzierten Niere der Maus signifikant, sobald das Steroid unmittelbar nach Folsäure appliziert wurde. Bei später erfolgender Gabe war die Wirkung wesentlich geringer. Gegenüber dem Proteingehalt waren die Prednisolon-Wirkungen deutlicher ausgeprägt als gegenüber dem Anstieg des DNS-Gehaltes.

6. Zusammenfassung

Rund 650 weiblichen Albino-Mäusen wurde Folsäure in Dosen von 60 - 150mg/kg Körpergewicht intravenös injiziert. Gegenstand der Untersuchungen waren das Verhalten von Organgewicht, Protein- und Desoxyribonucleinsäure-(DNS)- Gehalt sowie der Einfluß von Ganzkörper-Röntgenbestrahlung (GKB), Actinomycin D, Puromycin, Prednisolon, Polyvinylsulfat (PVS), Pentosanpolysulfat ($SP_{54}^{(R)}$), heterologer hochmolekularer Desoxyribonucleinsäure (DNS) und 2,4,6-Triäthylenimino-s-triazin (Triäthylenmelamin$^{(R)}$, TEM) auf die genannten Parameter unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

Die wesentlichsten Ergebnisse lassen sich zusammenfassen wie folgt:

1. Unter dem Einfluß von Folsäure in Dosen von 60-150mg/kg vergrößern sich das relative Gewicht sowie Protein- und DNS-Gehalt der Niere. Im allgemeinen erreichten die Veränderungen ihr Maximum am 2.-3. Versuchstag.
2. Der am 3. Tag nach Gabe von 150mg Folsäure/kg gemessene Anstieg des Protein- und DNS- Gehaltes wurde durch intravenöse Injektion von Actinomycin D, Puromycin, Prednisolon, PVS, $SP_{54}^{(R)}$, DNS oder TEM sowie durch GKB gehemmt. Dosen von 0,05mg, 0,5mg, 3,125mg, 25mg, 25mg, 12,5mg und 0,125mg pro kg Körpergewicht bzw. 325 R waren dabei besonders wirksam. Eine signifikante Abhängigkeit des Wirkungsgrades vom Applikationszeitpunkt zeigte sich innerhalb des 24stündigen Versuchszeitraumes nicht.
3. Der Anstieg des Protein-Gehaltes der Niere unter dem Einfluß hoher Folsäure-Dosen wurde vor allem durch Actinomycin D, Puromycin, Prednisolon, PVS, $SP_{54}^{(R)}$ und DNS gehemmt. Gegenüber dem Zuwachs an DNS waren TEM und GKB besonders wirksam.

4.Aus den Ergebnissen folgt:

a) Die Hyperplasie der Niere nach Schädigung durch Folsäure ist als Modell zum Nachweis hemmender Einflüsse auf Protein- und DNS- Synthese anwendbar.

b) Im Hinblick auf den Hemmechanismus ist die Messung von Protein- und DNS- Gehalt zu unspezifisch.

c) Polyanionen vom Typ des Heparins hemmen die Protein- (und DNS-) Synthese auch i n v i v o .

The effect of whole-body X-irradiation and drugs on the regeneration of mice kidneys following injury by folic acid.

To approximately 650 female albino mice folic acid was injected intraveneously in doses of 60 to 150mg/kg body weight. Subjects of the investigations were the behaviour of organ weight, protein- and deoxyribonucleic acid- content as well as the influences of whole-body X-irradiation, actinomycin D, puromycin, Prednisolone, poly(vinylsulfate)(PVS), pentosanepolysulfate ($SP_{54}^{(R)}$), deoxyribonucleic acid (DNA) and 2,4,6-triethyleneimino-s-triazine (triethylene melamine$^{(R)}$, TEM) upon these parameters under different experimental conditions.

The main results have to be summarized as follows:

1. Under the influence of folic acid in doses of 60 to 150mg/kg the relative weight as well as the protein- and DNA- content of the kidneys increased.
2. The increase of the protein- and DNA- content (as measured on the 3th day after i.v. injections of 150mg folic acid) was inhibited by intraveneous injection of actinomycin D, puromycin, Prednisolone, PVS, $SP_{54}^{(R)}$, DNA or TEM as well as by whole-body X-irradiation. In these experiments doses of 0,05mg, 0,5mg, 3,125mg, 25mg, 25mg, 12,5mg, 0,125mg per kg body-weight and 325 R respectively were most effective. A statistically significant correlation between the degree of inhibition and the time of application could not be shown within a 24 hour-period of experiment.
3. The rise of the protein- content of the kidney injured by folic acid was preferentially inhibited by actinomycin D, puromycin, Prednisolone, PVS, $SP_{54}^{(R)}$ and DNA. When inhibiting DNA-increase, TEM and whole-body X-irradiation were most effective.

4.The results suggest:

a)The hyperplasia of the kidney following injury by folic acid is suitable as a model to demonstrate inhibitory influences on protein- and DNA- synthesis.

b)As to studying mechanisms of inhibition the measurement of protein- and DNA- content is not enough spezific.

c)Polyanions with the structure of heparinoids inhibit the protein- and nucleic acid- synthesis in vitro and in vivo.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ALEXANDER, P.:
Interference with the formation of a nucleoprotein complex by radiomimetic compounds.
Nature (Lond.) 169, 226 (1952)

2. ALEXANDER, P.:
Comparison of the mode of action by which some alkylating agents and ionizing radiations kill mammalian cells.
Ann. N.Y.Acad.Sci. 163, 652-675 (1969)

3. ARNOLD, H.:
Einführung in die Chemie der Zytostatica.
Strahlentherapie 119, 147 (1962)

4. BACQ, Z.M., und P. ALEXANDER:
Grundlagen der Strahlenbiologie.
Stuttgart: Thieme 1958

5. BAUGNET-MAHIEU, I.,R. GOUTIER, and M. SEMAL:
Effects of total-body X-irradiation and AET on the activity of thymidine-phosphorylating kinases during liver regeneration.
Radiat. Res. 31, 808-825 (1967)

6. BEARD, N.SH.,jr.,ST.A. ARMENTROUT, and A.S. WEISBERGER:
Inhibition of mammalian protein synthesis by antibiotics.
Pharm. Rev. 21, 213-237 (1969)

7. BENES, L., and V. ROTREKLOVA:
Rate of synthesis and stability of DNA in bone marrow cells incubated with heparin.
Folia Biol.(Prag) 16, 196-204 (1970)

8. BERGEL, F.:
Gegenwärtiger Stand der Krebs-Chemotherapie, in Erg.Physiol.,biol.Chem.und exp.Pharm. 62, 101-106(1970)

9. BERNARDI, G.:
Competitive inhibition of acid deoxyribonuclease by polyribonucleotides.
Biochem.biophys.Res.Commun.17, 573 (1964)

10. von BERTALAUFFY, L.:
Wachstum, in: Handbuch der Zoologie, Bd. VIII
Hrsg.J.G.Helmcke,I.V.Lengerken und D.Starck
Berlin:Springer 1957

11. BERTOLD, M.F.:
Comparative study of methylases of the nucleic acids.
Anal.Fac.Quim.Farm., Univ.Chile 17, 40 (1965)
ref.Chem.Abs. 66.(15),No.62043n (1967)

12. BRADE, W., H. HERKEN, H.J. MERKER, W. DRESCHER:
Schädigung und Regeneration renaler Tubuluszellen nach Folsäuregabe.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.262, 228 (1969)

13. BRADE, W., H. HERKEN, H.J. MERKER, P. PROPPING:
Regeneration der Niere nach tubulärer Schädigung durch Pteridinderivate.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak. 264, 222 (1969)

14. BRADE, W. und P. PROPPING:
Akutes Nierenversagen nach Pteridinapplikation.
Klin. Wschr. 48, 1209-1216 (1970)

15. BRENNER, S., F. JACOB, and H. MESELSON:
An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis.
Nature (Lond.) 190, 576 (1961)

16. BRESNICK, E.:
Early changes in pyrimidine biosynthesis after partial hepatectomy.
J. biol. Chem. 240, 2550-2556 (1965)

17. BROOKS, B.R., and O.L. KLAMERTH:
Interaction of DNA with bifunctional aldehydes.
Europ. J. Biochem. 5, 178-182 (1968)

18. BROWN, R.F., SH.I. TAKAI, and I. LIEBERMAN:
Effect of inhibitors of protein synthesis on DNA formation in liver.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 209, 49-53 (1970)

19. BUDDECKE, E.:
Grungriß der Biochemie. p.105
Berlin: de Gruyter u. Co. 1970

20. CAVALIERI, L.F., and R.G. NEMCHIN:
The mode of interaction of actinomycin D with deoxyribonucleic acid.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 87, 641-652 (1964)

21. CERAMI, A., E. REICH, D.C. WARD, and J.H. GOLDBERG:
The interaction of actinomycin with DNA:Requirement for the 2-amino group of purines.
Proc. nat. Acad. Sci.(Wash.) 57, 1036-1042 (1967)

22. CHAMBON, P., P. RAMUZ, P. MANDEL, and J. DOLY:
Inhibition of RNA polymerase by sodium polyethylene sulfonate.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 149, 584 (1967)

23. COMOROSAN, S., S. SOLOMON, S. VIERU, M. STANESCU:
Relations between subcellular enzymic activity and detergents, macroanions and nonaqueous solvents.
Stud. cercet. biochim. 9, 147 (1966)

24. COMOROSAN, S., S. VIERU, H. GASPAR, D. SANDRU:
Nucleic acids and protein biosynthesis during alkylating with triethylene melamine in KB-cells.
Z. Krebsforsch. 71, 113-123 (1968)

25. CURRIE, G.A.:
Effect of heparin on mixed lymphocyte cultures.
Nature (Lond.) 215, 164 (1967)

26. DE MATTEIS, F.:
Stimulation of liver cholestrol synthesis by actinomycin D.
Biochem. J. 109, 775 (1968)

27. DREWS, J., A. WACKER:
Zum Wirkungsmechanismus der Steroidhormone.
Dtsch. med. Wschr. 91, 178 (1966)

28. DUSPIVA, F.:
Molekularbiologische Aspekte der Entwicklungsphysiologie.
Naturwiss. Rundschau 22, 191 (1969)

29. ELKIND, M.M., E. KUNO, H. SUTTON-GILBERT:
Cell killing by actinomycin D in relation to the growth cycle of chinese hamster cells.
J. Cell Biol. 42, 366-377 (1969)

30. EPIFANOVA, O.J., I.N. SMOLENSKAYA, M.V. SEVASTYANOVA, A.G. KURDYUMOVA:
Effects of actinomycin D and puromycin on the mitotic cycle in synchronized cell culture.
Exp. Cell Res. 58, 401-410 (1969)

31. FEINE, U.:
Radiomimetische Stoffe, p.943 in Strahlenbiologie, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Krebsforschung, Ergebnisse 1952-1958.
Stuttgart: Thieme 1959

32. FRIEDBERG, D., E. RINDE, and W. TROLL:
Competition between modified and unmodified DNA for RNA polymerase.
Fed. Proc. 27, 3271 (1968)

33. FRIMMER, M.:
Pharmakologie und Toxikologie.
Stuttgart-New York:Schattauer 1969

34. FUJIOKA, M., M. KOGA, and J. LIEBERMANN:
Metabolism of ribonucleic acid after partial hepatectomy.
J. biol. Chem. 238, 3401-3406 (1963)

35. GALLING, G.:
Über die Stimulierung des Aminosäure-Einbaues in vitro durch DNS in zellfreien Systemen aus Chlorella pyrenoidasa.
Z. Naturforsch. 22b, 348-351 (1967)

36. GELLERT, M., C.E. SMITH, D. NEVILLE, and G. FELSENFELD:
Actinomycin binding to DNA:Mechanism and spezifity.
J. molec. Biol. 11, 445-457 (1965)

37. GOUTIER, R.:
Effects of X-rays on nucleic acid biosynthesis and on the activity of nucleases in mammalian cells.
Progr. Biophys. 11, 54 (1961)

38. GREENMAN, D.C., F.T. KENNEY:
Effect of alterations in hormonal status of ribosomes of rat uterus.
Arch. Biochem. 107, 1 (1964)

39. GROS, F., H. BLATT, W. GILBERT, C.G. KURLAND, R.W. RISENBROUGH, J.D. WATSON:
Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of Eschericha Coli.
Nature (Lond.) 190, 561 (1961)

40. GULYI, M.F., F.P. MARTYNENKO, i. A.G. SABALDYR:
Role of oligonucleotides,nucleic acids and other polyanions in the biosynthesis of protein.
ref. Biol. Abs. 48,(24); No.120828 (1967)

41. GUZEK, J.W.:
Effect of corticotropin and cortisone on the incorporation of 3-H-thymidine into the deoxyribonucleic acids(DNA) of the regenerating liver in the white rat.
Acta endocr. (Kbh.) 59, 10-22 (1968)

42. HALLIBURTON, I.W., and R.Y. THOMSON:
Chemical aspects of compensatory renal hypertrophy.
Cancer Res. 25/II, 1882-1887 (1965)

43. v.HARNACK, G.-A.:
Allgemeine Wachstumsphysiologie, in:Einführung in die Entwicklungsphysiologie des Kindes.
Hrsg. H.Wiesener
Berlin-Göttingen-Heidelberg:Springer 1964

44. HARTMANN, G., M. BEHR, K.A. BEISSNER, K. HONIKEL, A. SIPPEL:
Antibiotics as inhibitors of nucleic acid and protein synthesis.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 7, 671-693 (1968)

45. HARTMANN, G.:
Antibiotica:Werkzeuge zur Erforschung der Nucleinsäure- und Protein-Synthese.
Chemie unserer Zeit 4, 26 (1970)

46. HEICKE, B.:
Über die Wirkung von Apurinsäure und Apyrimidinsäure auf die enzymatische Desoxyribonucleinsäure (DNA)-Synthese in vitro.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 266, 140-160 (1970)

47. HEICKE, B.:
Hemmung von DNA-Synthese und Zellvermehrung durch Apurinsäure und Apyrimidinsäure.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 266, 161-178 (1970)

48. HEIM, F., H. PAULY, M. SÄBEL und W. SCHWARZLOSE:
Der Einfluß ionisierender Strahlen auf die Protein-, RNS- und DNS-Menge und auf die Zahl der Zellkerne in der Leber neugeborener Mäuse.
Strahlentherapie 138, 742-748 (1969)

49. HEIM, F., W. SCHWARZLOSE, H. TRUCKENBRODT, P. MITZNEGG:
Desoxyribonucleinsäure-, Ribonucleinsäure- und Eiweiß-Gehalt, Zellneubildung und Zellgröße in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Ernährung und deren Beeinflussung durch anabole und antianabole Stoffe.
Z. Gerontol. 2, 25-47 (1969)

50. HEINEKE, H.:
Über die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf innere Organe.
Münch. med. Wschr. 51, 785 (1904)

51. HOLONBEK, V., L. FAUSHIER, and T.T. CROCKER:
The inhibition of nuclear RNA synthesis by added RNA.
Exp. Cell Res. 44, 262 (1966)

52. HÜBNER, I.J.:
Die physiologische Funktion der Nebennierenrinden-Hormone als Enzym-Induktoren.
Dtsch. med. Wschr. 81, 438 (1962)

53. HÜBNER, K.:
Histoautoradiographische Untersuchungen über das kompensatorische und regeneratorische Nierenwachstum.Aktuelle Probleme der Nephrologie.
Berlin-Heidelberg-New York:Springer 1966

54. HÜBNER, K.:
Rhythmische DNS-Synthese,ein biologisches Prinzip.
2.Arbeitstagg.über extraterrestische Biophysik und Biologie.
Marburg 1967

55. HÜBNER, K., P. KEMPF:
Histoautoradiographische Untersuchungen über die DNS-Synthese der Nieren nach Sublimatvergiftung.
Med. Welt 19 (N.F.):1867-1871 (1968)

56. JACOB, F., J. MONOD:
Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins.
J. molec. Biol. 3, 318 (1961)

57. JACOB, F., J. MONOD:
Genetic mapping of the elements of the lactose region.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 693 (1965)

58. KARLSON, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
7.Aufl. Stuttgart:Thieme 1970

59. KERSTEN, H.H.,and W. KERSTEN:
Inhibitors acting on DNA and their use to study DNA replication and repair.
20.Colloqu.Ges.Biol.Chem.,p.11-31.
Berlin-Heidelberg-New York:Springer 1969

60. KIDSON, C., K.S. KIBBY:
Selective alterations of mammalian messenger-RNA synthesis.Evidence for differential action of hormones on gene transcription.
Nature (Lond.) 203, 599 (1964)

61. KINOSHITA, S.:
Heparin as a possible initiator of genomic RNA synthesis in early development of sea urchin embryos.
Exp. Cell Res. 64, 403-411 (1971)

62. KRAEMER, R.J., and D.S. COFFEY:
The interaction of natural and synthetic polyanions with mammalian cells.II.Nuclear swelling.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 224, 568-578 (1970)

63. KRAEMER, R.J., and D.S. COFFEY:
The interactions of natural and synthetic polyanions with mammalian nuclei:DNA synthesis.
Fed. Proc. 29, No. 3698 (1970)

64. KRAEMER, R.J., and D.S. COFFEY:
The interaction of natural and synthetic polyanions with mammalian cells.I. DNA synthesis.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 224, 553-567 (1970)

65. KULMER, D., und H.D. OCHS:
Differenzierung der Wirkungsmechanismen alkylierender Cytostatica an Ehrlich-Ascitescarcinom- und lymphatischen Leukämiezellen.
Z. Krebsforsch. 73, 315-328 (1970)

66. LAJTHA, L.G., R. OLIVER, R. BERRY and W.D. NOYES:
Mechanism of radiation effect on the process of synthesis of deoxyribonucleic acid.
Nature (Lond.) 182, 1788 (1958)

67. LAJTHA, L.G.:
The effect of radiations on nucleic acid metabolism.
p.527 in: The nucleic acids,edited by E.Chargaff and J.N.Davidson, Vol.III,
New York,London:Academic press, inc.,1960

68. LAVAL, F., E. MALAISE, and J. LAVAL:
Heterologous DNA nuclear uptake by mouse DNA fibroblasts in vitro and its early fate.
Exp. Cell Res. 63, 69-77 (1970)

69. LAWLEY, P.D., and P. BROOKES:
Interstrand cross-linking of DNA by bifunctional alkylating agents.
J. mol. Biol. 25, 143-160 (1967)

70. LELUAN, G.,et M. PRASAD:
Mécanisme d'action des substances antibiotiques.
Bull. Chim. ther. No.3, 227 (1968)

71. LEVY, H.B.,R. ASOFSKY, F. RILEY, A. GARAPIN, H. CANTOR, and R. ADAMSON:
Mechanism of the antitumor action of polyinosinic: polycytidylic acid.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 173, 640-648 (1970)

72. LISS, E. und PALME, G.:
Der Einfluß von alkylierenden Cytostatica auf den Nucleinsäurestoffwechsel von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Z. Krebsforsch. 66, 196 (1964)

73. LISS, E.,A. REINEKE, und G. PALME:
Die Hemmung der Desoxyribonucleinsäure (DNS) Synthese und die Beeinflussung der Zellvermehrung von Yoshida-Ascitestumorzellen durch alkylierende Substanzen.
Arzneimittel-Forschung 19, 1137-1140 (1969)

74. LOWRY, O.H.,N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR,and R.J. RANDALL:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. biol. Chem. 193, 265 (1951)

75. MAGEE, P.N.:
Alkylation of nucleic acids and carcinogenesis.
p.79 in: 17.Colloqu.d.Ges.f.physik.Chemie am 21./23. April 1966 in Mosbach/Baden.
Berlin,Heidelberg,New York, Springer 1966

76. MIKOLAJEWSKI, V.:
Beeinflussung der Folatreduktase durch Triamteren und Triamterenderivate.
Inaug.-Diss.,Med.Fak.F.U.Berlin 1968

77. MORA, P.T.:
Relative importance of electrostatic forces in the interaction of ribonuclease and ribonucleic acid.
J. biol. Chem. 237, 3210 (1962)

78. MUELLER, G.C.:
Biochemical events in the animal cell cycle.
Fed. Proc. 28, 1780-1789 (1969)

79. MÜLLER, W.,and D.M. CROTHERS:
Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA.
J. mol. Biol. 35, 251 (1958)

80. MÜLLER, W.,und C. SPATZ:
Uber die Struktur des Actinomycin-Desoxyguanosin-Komplexes.
Z. Naturforsch. 20b, 842-853 (1965)

81. NEUBERT, D.:
Beeinflussung des Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsels durch Pharmaca.
Der Internist 7, 435 (1966)

82. NEUMANN, F.,R.von BERSWORDT-WALLRABE, W. ELGER and H. STEINBECK:
Activities of antiandrogens experiments in prepuberal and puberal animals and in foetuses.
In: J.Tamme: Testosterone, Stuttgart:Thieme 1968

83. NIRENBERG, M.,P. LEDER, M. BRENFIELD, R. BRIMACOMBE, J. TRUPIN, F. ROTTMANN, C. O'NEAL:
RNA codewords and proteinsynthesis.VII.On the general nature of the RNA code.
Proc. Nat. Acad. Sci.(Wash.) 53, 1161 (1963)

84. NIRENBERG, N.W., P. LEDER:
RNA codewords and protein synthesis.
Science 145, 1399 (1964)

85. PARTIER, B.:
Antibiotica,Molekularbiologische Wirkungsmechanismen.
Nova Acta Leopoldina,Neue Folge, Nr.188,34,20-33(1969)

86. PIERUCCI, O.:
Early effects of radiation on the biosynthesis of deoxyribonucleic acid.
Radiat. Res. 32, 760-779 (1967)

87. PROSKY, L., B. ROBERTS,jr.,R.G.O'DELL and R.L.IMBLUM:
Differential effects of actinomycin D on nucleic acid and protein synthesis in rat liver.
Arch. Biochem. Biophys. 126, 393-398 (1968)

88. REICH, E.,and J.H. GOLDBERG:
Actinomycin and nucleic acid funktion.In:Davidson,J.N. and E.W.Cohn(Eds.): Progr.Nucleic Acid Res. Molec. Biol. 3, 183-234 (1964)

89. REIF, W. und H.P. LANGE:
Nierenregeneration nach temporärer Ischämie.
Beitr. path. Anat. 138, 450-468 (1969)

90. RICHTER, E.,S. CLAUDITZ, B. LEINWEBER,and H.A. KÜHN:
The effect of glucocorticoid administration on protein synthesis in the healthy human liver.
German Med. Monthly 15,23-25 (1970)

91. ROTH, J.:
Einige Aspekte zum Wirkungsmechanismus von Antimetaboliten und alkylierenden Zytostatica auf den Zellstoffwechsel.
Hippokrates 40, 657-664 (1969)

92. RUDDON, R.W.,and J.M. JOHNSON:
The effect of nitrogen mustard on DNA template activity in purified DNA and RNA polymerase systems.
Molec. Pharmacol. 4, 258-273 (1968)

93. SCHERER, E., H.ST. STENDER:
Strahlenpathologie der Zelle.
G.Thieme, Stuttgart 1963

94. SCHMÄHL, D.:
Entstehung,Wachstum und Chemotherapie maligner Tumoren.
2.Aufl.-Aulendorf: Edition Cantor KG 1970

95. SCHNEIDER, W.C.:
Phosphorus compounds in animal tissues.I.Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid.
J. biol. Chem. 161, 293 (1945)

96. SCHOLTISSEK, CH.:
An unstable ribonucleic acid in rat liver nuclei.
Nature (Lond.) 194, 353 (1962)

97. SCHWARTZ, H.S., J.E. SONDERGREN:
Actinomycin D effects on nucleic acids during tumor regression.
Cancer Res. 28, 445-451 (1968)

98. SCHWARZLOSE, W.,und M.SÄBEL:
Der Einfluß von Actinomycin auf die Leber vorbestrahlter weißer Mäuse.
Strahlentherapie 139, 96-99 (1970)

99. SEKERIS, C.E.:
Neuere Ergebnisse zum Wirkungsmechanismus von Nebennierenrindenhormonen.
Dtsch. med. Wschr. 90, 1727 (1965)

100. SEROTA, F.T.,and R. BASERGA:
Polyinosinic acid.polycytidylic acid: Inhibition of DNA synthesis stimulated by isoproterenol.
Science 167, 1379-1380 (1970)

101. SIEBERT, G.:
Desoxyribonucleasen, p.1061 in:Hoppe-Seyler-Thierfelder:Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse.
10.Aufl.,New York: Springer 1966

102. SITTE, P. (Hrsg.)
Probleme der biologischen Reduplikation.
Berlin:Springer 1966

103. SKALKA, M., J. MATYASOVA, M. CEJKOVA:
Heparin-induced stimulation of in vitro incorporation of labelled thymidine into thymocyte nuclei.
Folia Biol. (Prag) 14, 466-470 (1968)

104. STÖCKER, E.:
Der Proliferationsmodus in Niere und Leber.
Verh. dtsch. Ges. Path. 50, 53-74 (1966)

105. TAYLOR, D.M., G. THRELFALL, and A.T. BUCK:
Stimulation of renal growth in the rat by folic acid.
Nature (Lond.) 212, 472 (1966)

106. TAYLOR, D.M., G. THRELFALL, and A.T. BUCK:
Chemically-induced renal hypertrophy in the rat.
Biochem. Pharmacol. 17, 1567 (1968)

107. TEMPEL, K.:
Fermentaktivierung unter dem Einfluß von ionisierenden Strahlen und Radiomimetica am Beispiel der Desoxyribonuclease II.
Berlin, Hamburg: Parey 1968

108. TEMPEL, K.:
Zur Wirkung von Desoxyribonucleinsäure und Heparinoiden auf den Nucleinsäurestoffwechsel der Maus.
Z. Naturforsch. 24b, 1550-1555 (1969)

109. TEMPEL, K., K. ZIPF und F. WOLF:
Zur Wirkung von Polyvinylsulfat auf Nucleinsäuren in vitro.
Berl., München: Tierärztl. Wschr. 81, 24 (1968)

110. THOMPSON, E.B., D.K. GRANNER, and G.M. TOMKINS:
Superinduction of tyrosine aminotransferase by actinomycin D in rat hepatoma cells.
J. mol. Biol. 54, 157-159 (1970)

111. THRELFALL, G., D.M. TAYLOR, and A.T. BUCK:
The effect of folic acid on growth and deoxyribonucleic acid synthesis in the rat kidney.
Lab. Invest. 15, 1477 (1966)

112. THRELFALL, G.:
Cell proliferation in the rat kidney induced by folic acid.
Cell Tissue Kint. 1, 382-392 (1968)

113. THRELFALL, G., and D.M. TAYLOR:
Modification of folic acid induced changes in renal nucleic acid and protein synthesis by actinomycin D and cycloheximide.
European. J. Biochem. 8, 591 (1969)

114. TIESLER, E., und B. HEICKE:
Aufnahme von Desoxyribonucleinsäure (DNA) durch Ascites-Tumorzellen der Maus.
Exp. Cell Res. 50, 524-540 (1968)

115. TILSON, M.D.:
A Dissimilar effect of folic acid upon growth of the rat kidney and small bowel.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 134, 95 (1970)

116. TSUKADA, K., and J. LIEBERMANN:
Synthesis of ribonucleic acid by liver nuclear and nucleolar preparations after partial hepatectomy.
J. biol. Chem. 239, 2952-2956 (1964)

117. VANDEPUTTE, M., S.K. DATTA, A. BILLIAU, and P. DESOMER:
Inhibition of polyoma-virus oncogenesis in rats by polyriboinosinic:ribocytidylic acid.
Eur. J. Cancer 6, 323-327 (1970)

118. Van LANCKER,J.L., K. ARIYAMA, and C. CHMURA:
The effect of whole-body X-radiation on the incorporation of 14C-lysine in nonproliferating tissues.
Radiat. Res. 44, 68-75 (1970)

119. WACKER, A.:
Genetische Information und Steroide.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.Pharmak. 253, 142 (1966)

120. WACKER, A., M. ISHIMOTO, und CH. CHANDRA:
Spezifische und unspezifische Hemmung der zellfreien Proteinsynthese mit Polyanionen.
Z. Naturforsch. 22b, 413 (1967)

121. WACKER, A., P. CHANDRA, I. HAENZEL, und D. GERICKE:
Effect of polyanions on the antibody formation by spleen cells.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 315, 1273-1276 (1970)

122. WALLRAFF, J.:
Leitfaden der Histologie des Menschen.
7.Aufl. 25ff. München,Berlin,Wien
Verlag Urban und Schwarzenberg 1967

123. WALTER, G., W. ZILLIG, P. PALM,and E. FUCHS:
Initiation of DNA-dependent RNA-synthesis and the effect of heparin on RNA-polymerase.
Europ. J. Biochem. 3, 194 (1967)

124. WATSON, J.D.:
Involvement of RNA in the synthesis of proteins.
Science 140, 3562 (1963)

125. WELLS, R.D., and J.E. LARSON:
Binding of actinomycin D to DNA and DNA model polymers.
J. mol. Biol. 49, 319-342 (1970)

126. WOLF, F.:
Zur Wirkung von Polyvinylsulfat auf Desoxyribonucleinsäure und Desoxyribonucleasen.
Diss. med. Vet., München 1967

127. ZAMENHOF, S., H. BURSZTYN, K. RICH, and P.J. ZAMENHOF:
The determination of deoxyribonucleic acid and of cell number in brain.
J. Neurochem. 11, 505 (1964)

Herrn Uni. Doz. Dr. K. T e m p e l gilt für
seinen wertvollen Rat und seine Anleitung
mein besonderer Dank.

L E B E N S L A U F

Am 20. August 1939 wurde ich als Sohn des damaligen Majors Willy Jähde und seiner Ehefrau Margarete, geb. Koch in Eisenach/Thüringen geboren.

Nach dem Besuch der Grund- und Oberschule in Eisenach legte ich dort im Mai 1957 die Reifeprüfung ab.

Daran schloß sich eine zweijährige Lehrzeit im VEB Automobilwerk Eisenach an, die im August 1959 mit der Facharbeiterprüfung als Werkzeugmacher beendet wurde.

Nach Verlassen der sog. DDR bestand ich nach einjähriger Schulzeit in Berlin-West die Zusatzprüfung zum Reifezeugnis.

Zunächst studierte ich an der TU-Berlin 3 Semester Maschinenbau, dann begann ich im Sommersemester 1962 mit dem Studium der Tiermedizin in München, das ich im Wintersemester 1966/67 mit dem Staatsexamen abschloß.

Nach dem Erhalten der Approbation am 1. Oktober 1967 war ich als Assistent in einer Großtierpraxis im Raum München tätig.

Im Mai 1969 begann ich mit der Arbeit an der vorliegenden Dissertation.